



DCM013-13

Ed. 05/2025

TSH ELISA

Determinazione immunoenzimatica del TSH nel siero o plasma umano**per analisi di routine**

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ test

REF DKO013

1. SCOPO PREVISTO

Per uso diagnostico *in vitro***Per uso professionale in laboratorio**

Il dosaggio TSH ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* destinato alla determinazione quantitativa dell'ormone stimolante la tiroide nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta.

2. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone stimolante la tiroide (TSH) è un ormone glicopolipeptidico sintetizzato e secreto dall'ipofisi anteriore, e regola la funzione endocrina della ghiandola tiroidea. Il TSH consiste di due subunità, la subunità α è identica a quella della gonadotropina corionica umana (HCG), dell'ormone luteinizzante (LH), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH); la subunità β è unica per il TSH e quindi ne determina la funzione.

Il TSH stimola la ghiandola tiroidea inducendo la secrezione di tirossina (T4) e il triiodotironina (T3).

La produzione di TSH è controllata dal Thyrotropin release hormone, (TRH), che è prodotto nell'ipotalamo ed è trasportato alla ghiandola pituitaria, in cui aumenta la produzione ed il rilascio di TSH. La somatostatina prodotta dall'ipotalamo ha, invece, un effetto opposto sulla produzione pituitaria di TSH, diminuisce o inibisce il relativo rilascio.

Il rilascio di TSH è regolato dalla frazione libera circolante degli ormoni tiroidei nel sangue. I livelli di TSH sono diminuiti quando le concentrazioni periferiche della frazione libera degli ormoni tiroidei sono alte. Per contro, livelli elevati di TSH sono presenti quando le concentrazioni periferiche degli ormoni tiroidei sono basse. Questo effetto genera un ciclo a feedback negativo.

I livelli di TSH sono misurati in pazienti sospetti di ipertiroidismo o ipotiroidismo, eccesso o carenza dell'ormone della tiroide. Livelli normali di TSH sono fra 0.3 e 3.0 mIU/L, ma l'interpretazione dipende dai livelli degli ormoni tiroidei (T3 e T4).

Livelli elevati di TSH uniti a livelli elevati degli ormoni tiroidei (T3 e T4) possono indicare una disfunzione dell'ipotalamo e della ghiandola pituitaria. In questo caso, livelli elevati di TSH sono prodotti spesso da un tumore benigno dell'ipofisi (adenoma). Per contro, livelli bassi di TSH e livelli bassi di T3 e T4 circolanti, indicano ipopituitarismo.

In caso di livelli anormalmente elevati di T3 e T4, dovuti alla sovrapproduzione nella tiroide, il meccanismo a feedback, descritto precedentemente, provoca bassi livelli di TSH. Ciò si presenta in malattie quali ipertiroidismo o la malattia di Grave. Per contro, un'ipoprodotto di T3 e T4 causata da malattie quali ipotiroidismo congenito (cretinismo), ipotiroidismo o resistenza dell'ormone tiroideo, provoca un aumento nei livelli di TSH.

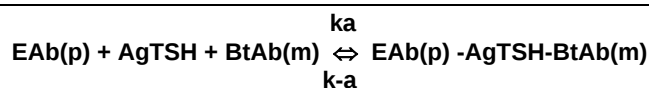
Chiaramente sia TSH che T3 e T4 dovrebbero essere misurati per accertare quale specifica disfunzione della tiroide è causata dall'ipofisi o dalla tiroide.

3. PRINCIPIO DEL METODO

I requisiti essenziali per un saggio immunoenzimatico sono anticorpi ad alta affinità e specificità (enzima coniugato e immobilizzato), con differenti e distinti epitopi.

In questo metodo l'anticorpo si lega alla superficie del pozzetto attraverso l'interazione della streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti-TSH monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi. Nei pozzetti della micropiastra la reazione tra antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



BtAb(m) = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

AgTSH = Antigene nativo (Quantità Variabile)

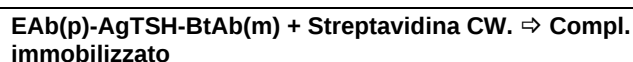
EAb(p) = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = Complesso Sandwich Antigene- Anticorpo

k_a = Costante di Associazione

k-a = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad affinità tra la Streptavidina e l' anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:



Streptavidina CW = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Compl. Immobilizzato = Legame sandwich Anticorpo-Antigene

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo è separata dall'antigene non legato mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima è quantificata mediante una reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

4. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (7 flaconi, 1 mL ciascuno)

ProClin >0,0015%

CAL0	REF DCE002/1306-0
CAL1	REF DCE002/1307-0
CAL2	REF DCE002/1308-0
CAL3	REF DCE002/1309-0
CAL4	REF DCE002/1310-0
CAL5	REF DCE002/1311-0
CAL6	REF DCE002/1312-0

2. Controlli (1 flacone, 1 mL ciascuno)

La concentrazione del Controllo è indicata nel Certificato di Analisi.

ProClin >0,0015%

REF DCE045/1303-0

3. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anticorpo goat anti TSH coniugato a perossidasi di rafano (HRP), anticorpo mouse anti TSH biotinilato. ProClin >0,0015% BSA 0,1%

REF DCE002/1302-0

4. Coated Microplate (1 micropietra breakable)

Micropietra coattata con streptavidina

REF DCE002/1303-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle),

ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L, ProClin >0,0015%

REF DCE054-0

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi

non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.

- Alcuni reagenti (calibratori, controllo, coniugato e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]

Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere / i fumi / i gas / la nebbia / i vapori / gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi / proteggere gli occhi / proteggere il viso / proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.
- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, i calibratori sono stabili a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere effettuato su campioni di siero o plasma.

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	24 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione. I calibratori sono pronti per l'uso e hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

I controlli sono pronti per l'uso; la concentrazione del controllo è stampata sull'etichetta.

9.2. Preparazione del Coniugato

Il Coniugato è pronto per l'uso.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 50X" con acqua distillata fino a un volume finale di 1000 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:50.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione del TSH può essere effettuata su siero o plasma umano.

Non sono necessari campioni a digiuno e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un miscelatore a rotazione.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati del test, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₆), due per il controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₆	50 µL		
Campione / Controlli		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22- 28 °C). Per incrementare la sensibilità prolungare il tempo di incubazione a 120 minuti.			
Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.			
Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiettando la piastra capovolta su un tovagliolo di carta assorbente.			
Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare per 20 minuti, al buio, a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o contro il bianco entro 5 minuti.			

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

I controlli forniti nel kit devono essere testati come se fossero sconosciuti e hanno lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁸.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. È necessario un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) o Cubic Spline **che includa il calibratore 0**. Gli altri algoritmi di adattamento della curva non sono raccomandati.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

NOTA: se l'assorbanza di un campione supera quella di C₆, il campione deve essere diluito in C₀ e rianalizzato. Correggere il risultato utilizzando un fattore di diluizione appropriato.

12. VALORI ATTESI

Campioni di siero di donne e uomini sani sono stati saggiati utilizzando il Dia.Metra TSH ELISA test, con i seguenti risultati:

	Media (mIU/L)	Valori attesi (mIU/L)
Adulta	1,85	0,39 – 6,16

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

13. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

13.1. Precisione

13.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 4,6\%$.

13.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 10,8\%$.

13.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L di TSH, ha dato un valore medio ($\pm$ SD) di $85,85\% \pm 2,62\%$.

13.3. Sensibilità

La concentrazione minima di TSH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,01 mIU/L con un limite di confidenza del 95%.

13.4. Specificità

La cross-reattività della tiotropina ELISA verso sostanze selezionate è stata valutata aggiungendo sostanze interferenti al siero a concentrazioni differenti. La cross-reattività è stata calcolata mediante il rapporto tra la dose della sostanza interferente e la quantità di TSH necessaria a dare la stessa assorbanza.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alpha (hTSH- α)	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH- β)	152 %
Follitropina (hFSH)	1,0 %
Ormone luteinizzante(hLH)	1,0 %
GonadotropinaCorionica(hCG)	<0,1 %

13.5. Correlazione con altri dosaggi

Il kit TSH ELISA è stato comparato con due diversi kits disponibili in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero. Le curve di regressione sono:

	Pendenza	Intercetta (mIU/L)	R ²
CLIA	0,96	0,06	0,972
ELISA	0,87	0,29	0,971

13.6. Effetto "Hook"

L'effetto hook è stato testato utilizzando concentrazioni di analita fino a 500 mIU/L. Non è stato osservato alcun effetto hook.

14. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.

- Non sono state stabilite le caratteristiche di azione di questo dosaggio nella popolazione pediatrica.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁹. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

15. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

16. BIBLIOGRAFIA

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., Clinical Chemistry 42: 135-139 (1996)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscatto, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

18. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.



DCM013-13

Ed. 05/2025

TSH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of TSH in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C $\Sigma = 96$ tests

REF DKO013

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use

For Laboratory Professional Use

TSH ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of thyroid stimulating hormone in human serum or plasma from an adult population.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

Thyroid-stimulating hormone (TSH or thyrotropin) is a glycopolypeptide hormone synthesised and secreted by the anterior pituitary gland which regulates the endocrine function of the thyroid gland. TSH consists of two subunits - *alpha* and *beta*. The α subunit is identical to that of human chorionic gonadotropin (HCG), luteinising hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH). The β (*beta*) subunit is unique to TSH, and therefore determines its function.

TSH stimulates the thyroid gland to secrete the hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3).

TSH production is controlled by a Thyrotropin Releasing Hormone (TRH). TRH is manufactured in the hypothalamus and transported to the pituitary gland, where it increases TSH production and release. Somatostatin is also produced by the hypothalamus and has an opposite effect on the pituitary production of TSH, decreasing or inhibiting its release.

Release of TSH is regulated by the circulating free fraction of thyroid hormones in the blood. TSH levels are depressed when peripheral concentrations of the free fraction of thyroid hormones are high. Conversely, TSH levels are high when peripheral concentrations of thyroid hormones are low. This effect creates a regulatory negative feedback loop.

TSH levels are tested in the blood of patients suspected of suffering from excess or deficiency of thyroid hormone hyperthyroidism or hypothyroidism respectively). Generally, a normal range for TSH is between 0.3 and 3.0 mIU/L, but the interpretation depends also on what the blood levels of thyroid hormones (T3 and T4) are.

Higher than normal levels of TSH combined with high levels of thyroid hormone (T3 and T4) may indicate dysfunction of the hypothalamus and pituitary gland. In this case, a high TSH is often produced by a benign tumour of the pituitary (adenoma). Conversely, low levels of TSH, while blood levels of T3 and T4 are also low, indicates abnormally low function of the pituitary, known as hypopituitarism.

Due to the negative feedback detailed above, abnormally high levels of Thyroid hormone, caused by overproduction in the thyroid, results in low TSH levels. This occurs in diseases such as hyperthyroidism or Grave's disease. Conversely, an underproduction of T3 and T4 caused by diseases such as congenital hypothyroidism (cretinism), hypothyroidism or thyroid hormone resistance, gives rise to an increase in the measured TSH.

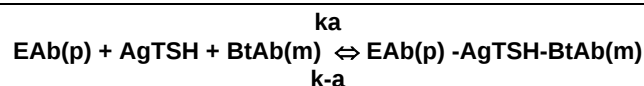
Clearly both TSH and T3 and T4 should be measured to ascertain where a specific thyroid disfunction is caused by primary pituitary or by a primary thyroid disease.

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this method, TSH calibrators, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labelled antibodies are added and the reactants mixed: these antibodies have high affinity and specificity and are detected against distinct and different epitopes of TSH. Reaction between the various TSH antibodies and native TSH occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



BtAb(m) = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

AgTSH = Native Antigen (Variable Quantity)

EAb(p) = Enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

K_a = Rate Constant of Association

K_{-a} = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well though the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + Streptavidin CW. ⇨ Immobilised Complex

Streptavidin CW. = Streptavidin immobilized on well
Immobilised Complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantified by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (7 vials, 1 mL each)

ProClin >0.0015%

CAL0	REF DCE002/1306-0
CAL1	REF DCE002/1307-0
CAL2	REF DCE002/1308-0
CAL3	REF DCE002/1309-0
CAL4	REF DCE002/1310-0
CAL5	REF DCE002/1311-0
CAL6	REF DCE002/1312-0

2. Control (1 vial, 1 mL each)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis. ProClin >0.0015% **REF** DCE045/1303-0

3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Goat anti- TSH conjugated with horseradish peroxidase (HRP); mouse anti- TSH biotinylated. ProClin >0.0015% BSA 0.1% **REF** DCE002/1302-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Streptavidin adsorbed on microplate **REF** DCE002/1303-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

ProClin <0.0015% **REF** DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact) **REF** DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. ProClin >0.0015% **REF** DCE006-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Precision Pipetting Devices

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, control, conjugate and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2 – 8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.

- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 – 28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the calibrators are stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2 – 8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum or plasma samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	24 hours
Freeze/thaw cycles	1 cycle

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

The calibrators are ready for use and have the following concentration:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0.2	0.5	2.5	5.0	10	20

The control is ready to use; the concentration is printed on the label.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial “50X Conc. Wash Solution” with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio.

9.4. Preparation of Samples

The determination of TSH can be performed in human serum or plasma samples.

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a roller mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22 – 28 °C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2 – 8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 – 8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₆), two for the Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₆	50 µL		
Sample/ Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	

Incubate 1 h at room temperature (22 – 28 °C).
To increase the sensibility read the absorbance after 120 min of incubation.

Remove the contents from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubate at 22 – 28°C for 20 minutes in the dark.

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

The mean concentration of the control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

DiaMetra recommends the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give

control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the QC certificate should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁸.

11. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, or cubic spline **including Calibrator 0 is required**. Other curve fitting algorithms are not recommended.

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Calibrator 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

NOTE: If the absorbance of a sample exceeds that of C₆, the sample should be diluted in C₀ and re-analysed. Correct the result using an appropriate dilution factor.

12. EXPECTED VALUES

Serum samples of apparently healthy women and men were assayed using the TSH ELISA test, with the following results:

	Mean (mIU/L)	Reference interval (mIU/L)
Adults	1.85	0.39 – 6.16

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

13. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

13.1. Precision

13.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 4.6%.

13.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is $\leq 10.8\%$.

13.2. Accuracy

The recovery of 0.25 – 2.5 – 10 mIU/L of TSH added to sample gave an average value ($\pm$ SD) of $85.85\% \pm 2.62\%$ with reference to the original concentrations.

13.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of TSH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.01 mIU/L with a confidence limit of 95%.

13.4. Specificity

The cross-reactivity of the thyrotropin ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by the ratio between the dose of the interfering substance and the amount of TSH needed to obtain the same absorbance.

Thyrotropin (hTSH)	100 %
Thyrotropin - alpha (hTSH- α)	9.3 %
Thyrotropin - beta (hTSH- β)	152 %
Follicle-Stimulating Hormone (hFSH)	1.0 %
Luteinising hormone (hLH)	1.0 %
Chorionic Gonadotropin (hCG)	<0.1 %

13.5. Method comparison

TSH ELISA was compared with two other commercially available TSH assays. 54 serum samples were tested. The two linear regression curves were calculated:

Assay type	Slope	Intercept (mIU/L)	R ²
CLIA	0.96	0.06	0.972
ELISA	0.87	0.29	0.971

13.6. Hook effect

The hook effect was tested using concentrations of analyte up to 500 mIU/L. No hook effect was observed.

14. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- The performance characteristics of this assay have not been established in a paediatric population.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁹. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be

prone to this interference and anomalous values may be observed.

15. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

16. BIBLIOGRAPHY

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., Clinical Chemistry 42: 135-139 (1996)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

17. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

18. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 05/2025

DCM013-13



DCM013-13

Ed. 05/2025

TSH ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de TSH en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta
externa2°C  8°C $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO013

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

El ensayo TSH ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa de la hormona estimulante de la tiroides en suero o plasma humano de una población adulta.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

La hormona estimulante de la tiroides (TSH o tirotropina) es una hormona glicopéptida sintetizada y secretada por la hipófisis anterior y regula la función endocrina de la glándula tiroides. La TSH está formada por dos subunidades: la subunidad α es idéntica a la de la gonadotropina coriónica humana (HCG), la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH); la subunidad β es única para la TSH y, por lo tanto, determina su función.

La TSH estimula la glándula tiroides induciendo la secreción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3).

La producción de TSH se controla por la hormona de liberación de tirotropina (TRH), que se produce en el hipotálamo y es transportada a la glándula pituitaria, en la que aumenta la producción y la liberación de TSH. Sin embargo, la somatostatina producida por el hipotálamo tiene un efecto opuesto en la producción pituitaria de TSH, puesto que disminuye o inhibe su liberación.

La liberación de TSH está regulada por la fracción libre circulante de hormonas tiroideas en la sangre. Los niveles de TSH disminuyen cuando las concentraciones periféricas de la fracción libre de hormonas tiroideas son altas. Por el contrario, se presentan niveles altos de TSH cuando las concentraciones periféricas de las hormonas tiroideas son bajas. Este efecto genera un ciclo de retroalimentación negativa.

Los niveles de TSH se midieron en pacientes con sospecha de hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso o carencia de la hormona tiroidea. Los niveles normales de TSH se encuentran entre 0,3 y 3,0 mIU/L, pero la interpretación depende de los niveles de las hormonas tiroideas (T3 y T4).

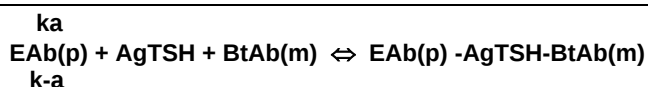
Niveles elevados de TSH junto con niveles elevados de las hormonas tiroideas (T3 y T4) pueden indicar una disfunción del hipotálamo y de la glándula pituitaria. En este caso, los niveles altos de TSH se producen a menudo por un tumor benigno hipofisario (adenoma). Por el contrario, niveles bajos de TSH y niveles bajos de T3 y T4 circulantes indican hipopituitarismo.

En caso de niveles anormalmente elevados de T3 y T4, debidos a la sobreproducción en la tiroides, el mecanismo de retroalimentación, descrito anteriormente, provoca bajos niveles de TSH. Así se presenta en enfermedades como el hipertiroidismo o la enfermedad de Graves. Por el contrario, una baja producción de T3 y T4 causada por enfermedades como el hipotiroidismo congénito (cretinismo), hipotiroidismo o resistencia de la hormona tiroidea, provoca un aumento de los niveles de TSH.

Claramente, se deben medir ya sea la TSH o T3 y T4 para determinar qué disfunción tiroidea específica es causada por la hipófisis o por la tiroides.

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los requisitos esenciales para un ensayo inmunoenzimático son anticuerpos de alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados), con epítopos distintos. En este procedimiento, el anticuerpo se une a la superficie del pocillo mediante la interacción de la estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-TSH monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



BtAb(m) = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

AgTSH = antígeno nativo (cantidad variable)

EAb(p) = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) = complejo sándwich antígeno-anticuerpo
ka = constante de asociación
k-a = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + estreptavidina CW. ⇒ Compl. inmovilizado

Estreptavidina C.W. = estreptavidina inmovilizada en el pocillo
Compl. inmovilizado = enlace sándwich anticuerpo-antígeno

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante un lavado. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (7 viales de 1 mL cada uno)

ProClin >0,0015%

CAL0	REF DCE002/1306-0
CAL1	REF DCE002/1307-0
CAL2	REF DCE002/1308-0
CAL3	REF DCE002/1309-0
CAL4	REF DCE002/1310-0
CAL5	REF DCE002/1311-0
CAL6	REF DCE002/1312-0

2. Control (1 vial de 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis). ProClin >0,0015%

REF DCE045/1303-0

3. Conjugado (1 vial, 13 mL)

Anticuerpo cabra anti TSH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP); anticuerpo ratón anti TSH biotinilado. ProClin >0,0015% y BSA 0,1%

REF DCE002/1302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Una microplaca recubierta con estreptavidina

REF DCE002/1303-0

4. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel).

Contiene ProClin <0,0015%

REF DCE004-0

5. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

6. Conc. 50X Solución de lavado (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

REF DCE006-0

4.2. Materiales necesarios pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos (calibradores, control, conjugado y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Atención

Contiene: ProClin 300

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo / el humo / el gas / la niebla / los vapores / el aerosol.

P280 - Llevar guantes / ropa de protección / equipo de protección para los ojos / la cara / los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo y/o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles y/o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, los calibradores son estable a 2-8 °C durante 6 meses.

- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe realizarse usando muestras de suero (o plasma).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	24 horas
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

Los controles están listos para su uso; la concentración del control está impresa en la etiqueta.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para usar.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «50X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:50.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación de TSH se puede realizar en muestras de suero o plasma humano.

Las muestras en ayunas no son necesarias ni se requieren preparaciones especiales de las muestras.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación.

Almacenar la muestra a -20 °C si la determinación no se lleva a cabo el mismo día que se recoge la muestra. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.

- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2- 8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana y/o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₆), dos para el control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₆	50 µL		
Muestra / Controles		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente (22- 28 °C). Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente. Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.			
Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incube durante 20 minutos en un lugar oscuro a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
Agite suavemente la microplaca. Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.			

10. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

Los controles incluidos en el kit deberán ser probados como desconocidos y están destinados a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se

realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

DiaMetra recomienda que los usuarios mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los análisis que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el certificado de control de calidad deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁸.

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Es necesario un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL) o modelo spline cúbico **incluido el calibrador 0**. Se puede usar un ajuste de splines suavizado y un ajuste logarítmico-logarítmico que incluya el calibrador 0. No se recomiendan otros algoritmos de ajuste de curva.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

NOTA: Si la absorbancia de una muestra excede la de C₆, la muestra debe diluirse en C₀ y volver a analizarse. Corrija el resultado utilizando un factor de dilución adecuado.

12. VALORES ESPERADOS

Las muestras de suero en mujeres y hombres sanos se han analizado utilizando el TSH IEMA TEST con los siguientes resultados:

	Media (mIU/L)	Valores esperados (mIU/L)
adulto	1,85	0,39 – 6,16

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

13. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

13.1. Precisión

13.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (16x) la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es $\leq 4,6\%$.

13.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (12x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 10,8\%$.

13.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L de TSH ha dado un valor medio ($\pm$ SD) de $85,85\% \pm 2,62\%$.

13.3. Sensibilidad

Tomando como base los resultados de la determinación del valor del Calibrador 0 de 16 réplicas, la concentración mínima medible con este método es de 0,01 mIU/L con un límite de confianza del 95%.

13.4. Especificidad

La reactividad cruzada de la tirotropina ELISA a las sustancias seleccionadas se estimó mediante la adición de sustancias interferentes al suero en concentraciones distintas. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la dosis de la sustancia interferente y la cantidad de TSH necesaria para producir la misma absorbancia.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alfa (hTSH- α)	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH- β)	152 %
Folotropina (hFSH)	1,0 %
Hormona luteinizante (hLH)	1,0 %
Gonadotropina coriónica (hCG)	<0,1 %

13.5. Correlación con otros métodos

El kit TSH ELISA (Dia.Metra) se ha comparado con dos kits distintos disponibles en el mercado. Se han comprobado 54 muestras de suero.

Las curvas de regresión son:

	Pendiente	Intersección (mIU/L)	R ²
CLIA	0,96	0,06	0,972
ELISA	0,87	0,29	0,971

13.6. Efecto gancho

El efecto gancho se probó utilizando concentraciones de analito de hasta 500 mIU/L. No se observó efecto gancho.

14. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Las características de rendimiento de este análisis no se han establecido para una población pediátrica.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁹. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

15. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

16. BIBLIOGRAFÍA

1. Hopton M. R, et al Clinical Chemistry, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. Lancet, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al Clinical Chemistry 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al Eur. J. Endocrinol 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, Clinical Chemistry 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., Clinical Chemistry 42: 135-139 (1996)
8. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
9. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. Clin Chem, 34, 1988, pp 27–33

17. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

18. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante y/o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional.

Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los

datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 05/2025

DCM013-13

	DE <i>In vitro</i> Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> FR Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> EN <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> PT Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par EN Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement EN Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication EN Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) EN Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique EN Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi EN Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot EN Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests EN Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret EN Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation EN Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue EN Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil EN Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		