



## FICHA TÉCNICA PRODUCTO

<i>Descripción producto</i>	<i>Código Menarini</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Código Fabricante</i>
TRAb 3 <sup>a</sup> gen	30652	RSR LTD.	TRE/96/3

**Kit para ELISA de autoanticuerpos antirreceptor de TSH de 3.ª generación - Instrucciones de uso**



**RSR Limited**

Parc Ty Glas, Llanishen,  
Cardiff CF14 5DU Reino Unido  
Tel.: +44 29 2068 9299 Fax: +44 29 2075 7770  
Correo electrónico: info@rsrltd.com Sitio web: www.rsrltd.com



Advena Ltd. Tower Business Centre, 2<sup>nd</sup> Flr.,  
Tower Street, Swatar, BKR 4013 Malta.

**USO PREVISTO**

El kit para ELISA de autoanticuerpos antirreceptor de TSH (TRAb, del inglés *TSH receptor autoantibody*) de RSR es solo para uso profesional y está previsto para la determinación cuantitativa de TRAb en suero humano. El hipertiroidismo por enfermedad de Graves-Basedow se debe a la presencia de autoanticuerpos antirreceptor de TSH, por lo que la determinación de estos anticuerpos puede resultar útil en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

B. Rees Smith *et al.* A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies. *Thyroid* 2004 **14**: 830-835  
K. Kamijo *et al.* Clinical Evaluation of 3rd Generation assay for Thyrotropin Receptor Antibodies: The M22-biotin-based ELISA initiated by Smith. *Endocrine Journal* 2005 **52**: 525-529  
A. Theodoraki *et al.* Performance of a third-generation TSH-receptor antibody in a UK clinic. *Clinical Endocrinology* 2011 **75**: 127-133

**PATENTES**

Se aplican las siguientes patentes:  
Patentes estadounidenses US 8,110,664 B2.

**PRINCIPIO DEL ENSAYO**

En el ensayo ELISA, se deja que los autoanticuerpos antirreceptor de TSH en los sueros de los pacientes, los calibradores y los controles interactúen con el receptor de TSH que recubre los pocillos de la placa de ELISA. Tras incubar durante 2 horas, se desechan las muestras dejando los TRAb unidos al receptor inmovilizado. En un segundo paso de incubación, se añade un autoanticuerpo monoclonal humano antirreceptor de TSH marcado con biotina (M22-biotina), que interactúa con el receptor de TSH inmovilizado que no ha sido bloqueado por los TRAb unidos. A continuación, en un tercer paso de incubación, se determina la cantidad de M22-biotina unida a la placa. Para ello, se añade estreptavidina-peroxidasa (SA-POD), que se une específicamente a la biotina. Luego se desecha el exceso de SA-POD que no se ha unido y se añade el sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), que produce la aparición de un color azul. Esta reacción se detiene mediante la adición de una solución de parada, que hace que el contenido de los pocillos cambie de color

azul a amarillo. Por último, se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 450 nm mediante un lector de placas de ELISA. Una absorbancia menor indica la presencia de TRAb en una muestra problema, ya que estos autoanticuerpos inhiben la unión de M22-biotina al receptor de TSH que recubre los pocillos de la placa. El intervalo de medición es de 0,4–30 UI/l (NIBSC 08/204).

**CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PROBLEMA DE SUERO**

Los sueros a examinar deben analizarse poco después de su separación o conservarse, preferiblemente en partes alícuotas, a una temperatura de -20 °C o inferior. La cantidad de 150 µl es suficiente para un ensayo (determinaciones de 75 µl por duplicado). Deben evitarse la congelación y descongelación repetidas, así como el aumento de la temperatura de conservación. La conservación incorrecta de las muestras de suero puede ocasionar la pérdida de actividad de los TRAb. No utilizar sueros hemolizados o de aspecto lechoso por exceso de lípidos, ni muestras que contengan partículas. No utilizar plasma en el ensayo. Cuando se requiera, descongelar los sueros problema a temperatura ambiente y mezclar con cuidado para asegurar la homogeneidad. Centrifugar el suero antes del ensayo (preferiblemente durante 5 minutos a 10–15 000 r.p.m. en una microcentrífuga) para eliminar las partículas. No debe omitirse este paso de centrifugación en el caso de sueros turbios o con partículas.

**SÍMBOLOS**

Símbolo	Significado
	Declaración CE de conformidad
	Producto sanitario para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Número de catálogo
	Código de lote
	Consúltense las instrucciones de uso
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> utilizations
	Fecha de caducidad
	Limitación de temperatura
	Control negativo
	Control positivo

### MATERIAL NECESARIO NO SUMINISTRADO

Pipetas para dispensar 50 µl, 75 µl y 100 µl, así como volúmenes adecuados para diluir la SA-POD (F).

Medios para diluir la solución de lavado concentrada (I).

Agua pura.

Lector de placas de ELISA adecuado para formatos de 96 pocillos y que permita medir a 450 nm.

Agitador de placas de ELISA con una velocidad de 500 agitaciones/min (que no sea un agitador orbital).

Tapa para placas de ELISA.

### PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

Conservar el kit sin abrir y todos los componentes del kit (A–J) a una temperatura de 2–8 °C.

<b>A</b>	<b>Pocillos recubiertos con receptor de TSH</b> 12 tiras rompibles de 8 pocillos cada una (96 en total) en un marco de soporte, dentro de una bolsa sellada de aluminio. Dejar en reposo a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de abrir.
	Asegurarse de que las tiras están bien encajadas en el marco de soporte suministrado. Tras la apertura, volver a introducir las tiras de pocillos sin usar en la bolsa de aluminio original y sellar con cinta adhesiva. Colocar esta bolsa dentro de la bolsa de plástico de autocierre con desecante suministrada. Conservar a 2–8 °C durante un máximo de 15 semanas.
<b>B</b>	<b>Tampón de inicio</b> 10 ml Color amarillo Listo para usar
<b>C1–5</b>	<b>Calibradores</b> 0,4, 1,0, 2,5, 10 y 30 UI/l (unidades NIBSC 08/204) 5 × 1,0 ml Listos para usar
<b>D1</b>	<b>Control negativo</b> 1,0 ml Listo para usar
<b>D2</b>	<b>Control positivo</b> <b>(Ver la etiqueta para conocer el intervalo de concentración)</b> 1,0 ml Listo para usar
<b>E</b>	<b>M22-biotina</b> 15 ml Color rojo Listo para usar
<b>F</b>	<b>Estreptavidina-peroxidasa (SA-POD)</b> 0,75 ml Concentrada
	Diluir 1:20 con diluyente para SA-POD (G). Por ejemplo, 0,5 ml (F) + 9,5 ml (G). Tras la dilución, conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
<b>G</b>	<b>Diluyente para SA-POD</b> 15 ml Listo para usar

<b>H</b>	<b>Sustrato de peroxidasa (TMB)</b> 15 ml Listo para usar
<b>I</b>	<b>Solución de lavado concentrada</b> 100 ml Concentrada
	Diluir hasta 1 litro con agua pura antes de utilizarla. Conservar a 2–8 °C hasta la fecha de caducidad del kit.
<b>J</b>	<b>Solución de parada</b> 10 ml Lista para usar

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Dejar reposar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20–25 °C) durante al menos 30 minutos antes de utilizarlos. Se recomienda utilizar una pipeta de repetición de tipo Eppendorf en los pasos 1, 5, 8, 10 y 11. Es muy recomendable realizar determinaciones por duplicado de los sueros problema, los calibradores y los controles.

<b>1.</b>	Pipetear <b>75 µl</b> de tampón de inicio (B) en los pocillos correspondientes, dejando el último pocillo vacío para el blanco (ver el paso 12).
<b>2.</b>	Pipetear <b>75 µl</b> de calibradores (C1–5), controles (D1 y D2) y sueros problema en los pocillos correspondientes (empezar por el calibrador de 30 UI/l e ir bajando por la placa hasta el control negativo y, por último, los sueros problema; se recomienda hacerlo por duplicado), dejando el último pocillo vacío.
<b>3.</b>	Tapar el marco de soporte y agitar los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente (20–25 °C) en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por minuto).
<b>4.</b>	Aspirar el contenido de los pocillos con un lavador de placas o desecharlo invirtiendo rápidamente el marco de soporte de los pocillos encima de un recipiente adecuado. Lavar los pocillos una vez añadiendo solución de lavado (I) diluida y aspirar el líquido de lavado con un lavador de placas, o desear el líquido de lavado invirtiendo rápidamente el marco de soporte de los pocillos encima de un recipiente adecuado. Golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente limpia y seca para eliminar el exceso de solución de lavado (solo es necesario si se limpia manualmente la placa).
<b>5.</b>	Pipetear <b>100 µl</b> de M22-biotina (E) en cada pocillo (excepto el blanco). Evitar que el material salpique fuera de los pocillos durante la adición.
<b>6.</b>	Tapar el marco de soporte e incubar a temperatura ambiente durante 25 minutos sin agitar.
<b>7.</b>	Repetir el paso 4 de lavado.
<b>8.</b>	Pipetear <b>100 µl</b> de SA-POD (F) diluida en cada pocillo (excepto el blanco) e incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitar.
<b>9.</b>	Aspirar el contenido de los pocillos con un

	lavador de placas o desecharlo invirtiendo rápidamente el marco de soporte de los pocillos encima de un recipiente adecuado. Lavar los pocillos dos veces con solución de lavado (I) diluida y una vez con agua pura (para eliminar la espuma). Golpear suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie absorbente limpia y seca para eliminar el exceso de solución de lavado (si se utiliza un lavador de placas, la placa puede lavarse 3 veces únicamente con solución de lavado [I] diluida).
10.	Pipetear <b>100 µl</b> de TMB (H) en cada pocillo (incluido el blanco) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitar.
11.	Pipetear <b>50 µl</b> de solución de parada (J) en cada pocillo (incluido el blanco). Tapar el marco de soporte y agitar durante unos 5 segundos en un agitador de placas. Hay que asegurarse de que los tiempos de incubación con el sustrato sean los mismos para cada uno de los pocillos.
12.	Al cabo de 15 minutos, leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm con un lector de placas de ELISA, utilizando como blanco el pocillo que contiene únicamente <b>100 µl</b> de TMB (H) y <b>50 µl</b> de solución de parada (J).

#### ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

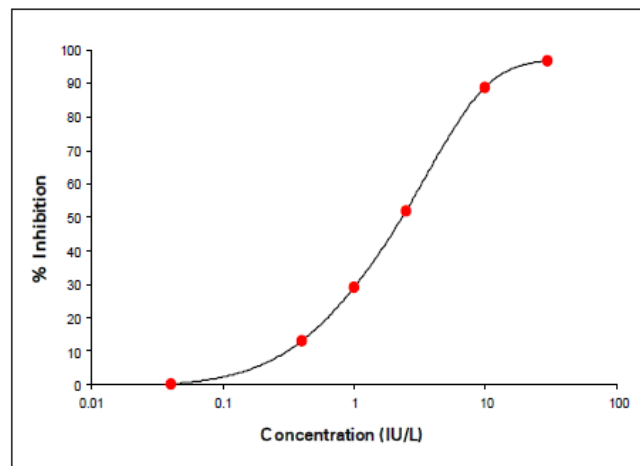
Se puede establecer una curva de calibración representando gráficamente la concentración de calibrador en el eje de las abscisas (escala logarítmica) y la absorbancia de los calibradores en el eje de las ordenadas (escala lineal). A continuación, se pueden leer las concentraciones de TRAb en los sueros de los pacientes a partir de la curva de calibración (representada en RSR en forma de curva *spline* semilogarítmica [factor de ajuste = 0]). Se pueden utilizar otros sistemas de reducción de datos. Al control negativo se le puede asignar un valor de 0,04 para facilitar el tratamiento informático de los resultados del ensayo. Los resultados también se pueden expresar como inhibición (% Inh.) de la unión de M22, calculada con la fórmula:

$$100 \times \left| 1 - \frac{\text{absorbancia de la muestra problema a 450 nm}}{\text{absorbancia del control negativo (D1) a 450 nm}} \right|$$

Las muestras con una concentración elevada de TRAb pueden diluirse con el control negativo del kit (D1). Por ejemplo, 20 µl de muestra más 180 µl de control negativo para obtener una dilución 10x. Pueden prepararse otras diluciones (p. ej., 100x) a partir de la dilución 10x o de otra forma, según convenga. Algunos sueros no se diluirán de forma lineal, por lo que para el cálculo de la concentración de TRAb se recomienda utilizar la dilución con la que se obtenga un valor aproximado al 50 % de inhibición.

#### RESULTADOS TÍPICOS (a modo de ejemplo, no utilizar para calcular los resultados reales)

Muestra	Absorbancia a 450 nm (excepto el blanco)	% Inh.	UI/l
Control D1	2,289		
C1	1,910	17	0,4
C2	1,553	32	1
C3	1,008	56	2,5
C4	0,278	88	10
C5	0,077	97	30
Control D2	1,231	46	1,8



% Inhibición  
Concentración (UI/l)

#### VALOR DE CORTE DEL ENSAYO

	UI/l
Negativo	<0,4 UI/l
Positivo	≥0,4 UI/l

Este valor de corte ha sido validado por RSR. No obstante, cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia normales y patológicos para las concentraciones de TRAb. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio grupo de muestras de control en el ensayo.

#### EVALUACIÓN CLÍNICA

##### Especificidad clínica

Se analizaron 139 sueros de donantes de sangre sanos con el kit para ELISA de TRAb de 3.ª generación de RSR, todos los cuales dieron negativo para TRAb.

##### Sensibilidad clínica

Se analizaron 108 sueros de pacientes con la enfermedad de Graves-Basedow (pacientes tratados y no tratados), de los cuales 103 (95 %) dieron positivo para TRAb.

##### Límite inferior de detección

El control negativo del kit se analizó 50 veces y se calcularon la media y la desviación estándar. El límite inferior de detección con 2 desviaciones estándar fue de 0,08 UI/l.

### Precisión interensayo

Muestra	UI/l (n = 20)	CV (%)
1	5,5	8,7
2	1,6	8,9

### Precisión intraensayo

Muestra	UI/l (n = 21)	CV (%)
3	1,3	5,5
4	5,1	4,2

### Exactitud clínica

El análisis de los sueros de los pacientes con una enfermedad autoinmunitaria distinta de la enfermedad de Graves-Basedow no mostró ninguna interferencia de los autoanticuerpos contra la tiroglobulina, la peroxidasa tiroidea, la descarboxilasa del ácido glutámico, la 21-hidroxilasa, el receptor de acetilcolina o el ADNdc, o del factor reumatoide.

### Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron las siguientes sustancias a las muestras: hemoglobina a 5 mg/ml, bilirrubina a 0,2 mg/ml, intralípidos hasta 30 mg/ml, LH humana hasta 10 u/ml, GCh hasta 160 u/ml, FSH humana hasta 70 u/ml y TSH humana hasta 3 mu/ml.

### CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA SEGURIDAD

#### Streptavidina-peroxidasa (SA-POD)

**Palabra de advertencia:** Atención



**Indicaciones de peligro**

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

**Consejos de prudencia**

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P302 + P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua y jabón.

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.

#### Sustrato de peroxidasa (TMB)

**Palabra de advertencia:** Peligro



**Indicaciones de peligro**

H360: Puede perjudicar la fertilidad o dañar al feto.

**Consejos de prudencia**

P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P308 + P313: EN CASO DE exposición manifiesta o presunta: Consultar a un médico.

#### Diluyente para SA-POD y solución de lavado concentrada

**Indicaciones de peligro**

EUH 208: Contiene 2-cloroacetamida. Puede provocar una reacción alérgica.

Este kit es solo para uso profesional *in vitro*. Seguir cuidadosamente las instrucciones. Respetar las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas y la estabilidad especificada para los pocillos recubiertos y los reactivos diluidos. Consultar la ficha de datos de seguridad para obtener información más detallada sobre la seguridad. El material de origen humano utilizado en la preparación del kit ha sido analizado y ha dado negativo para anticuerpos anti-VIH-1 y 2 y anti-VHC y para HBsAg; no obstante, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Lavarse bien las manos si ha habido contaminación y antes de irse del laboratorio. Esterilizar todos los residuos potencialmente contaminados, incluidas las muestras problema, antes de su eliminación. Si bien el material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos, debe manipularse como potencialmente infeccioso. Algunos componentes contienen cantidades pequeñas de azida de sodio como conservante. Evitar la ingestión, la inhalación, la inyección y el contacto con la piel, los ojos y la ropa de todos los componentes del kit. Evitar la formación de azidas de metales pesados en el sistema de desagüe. Para ello, dejar correr agua abundante al aclarar cualquier componente del kit.

### PLAN DE ENSAYO

Dejar reposar todos los reactivos y las muestras a temperatura ambiente (20–25 °C) antes de utilizarlos	
Pipetear:	75 µl de tampón de inicio en cada pocillo (excepto el blanco)
Pipetear:	75 µl de calibradores (empezando por la concentración más alta e ir descendiendo hasta la más baja), controles, sueros de los pacientes (excepto el blanco)
Incubar:	2 horas a temperatura ambiente en un <b>agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min</b>
Aspirar/decantar:	Placa
Lavar:	La placa una vez en un lavador automático (o lavar una vez, invertir y secar golpeando suavemente sobre un material absorbente en caso de lavado manual)
Pipetear:	100 µl de M22-biotina en cada pocillo (excepto el blanco)
Incubar:	25 minutos a temperatura ambiente <b>sin agitar</b>
Aspirar/decantar:	Placa
Lavar:	La placa una vez (ver arriba)
Pipetear:	100 µl de SA-POD (diluida 1:20) en cada pocillo (excepto el blanco)
Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente <b>sin agitar</b>
Aspirar/decantar:	Placa
Lavar:	La placa tres veces en un lavador automático (o lavar dos veces, aclarar una vez con agua pura y secar sobre un material absorbente en caso de lavado manual)
Pipetear:	100 µl de TMB en cada pocillo (incluido el blanco)
Incubar:	30 minutos a temperatura ambiente <b>en la oscuridad y sin agitar</b>

Pipetear:	<b>50 <math>\mu</math>l</b> de solución de parada en cada pocillo (incluido el blanco) y agitar durante 5 segundos
Leer la absorbancia a 450 nm en los 15 minutos posteriores a la adición de la solución de parada	
<b>No realizar el ensayo a una temperatura superior a 25 °C.</b>	