CE

DiaMetra
care for quality

DCM085-7
Ed. 01/2015

TSH RECEPTOR Ab

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli autoanticorpi contro i recettori della tirotropina (TRAb) in siero umano

IVD | **LOT** Vedere etichetta esterna | 2°C 8°C | Σ = 96 test | **REF DKO085**

DESTINAZIONE D'USO

TSH Receptor Ab (TRAb) ELISA è un test ad uso professionale per la determinazione quantitativa degli autoanticorpi specifici del recettore tirotropina in siero umano.
Il kit TSH Receptor Ab è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ipertiroidismo è una patologia in cui si ha un aumento dei livelli circolanti degli ormoni tiroidei. In alcune casi come nella malattia di Graves questo è causato da autoanticorpi contro il recettore TSH (TSHr). Gli autoanticorpi mimano l' effetto del TSH sulla tiroide provocando un aumento dei livelli sanguigni di T3 e T4. La determinazione di questi autoanticorpi (TRAb) può essere utile per la diagnosi della malattia e per la sua cura. La cura principale per il morbo di Graves è rappresentata dall' utilizzo di farmaci antitiroidei (propiltiouracile o metimazolo), dallo I^{131} e dalla chirurgia. Il dosaggio del TRAb risulta quindi utile anche in corso o al termine della terapia.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel TSH Receptor Ab (TRAb) ELISA test gli autoanticorpi specifici del recettore TSH presenti nel siero dei pazienti, nei calibratori e nei controlli reagiscono con il recettore TSH adsorbito sulla piastra. Dopo un' incubazione di 2 ore, i campioni sono allontanati lasciando i TRAb legati al recettore TSH immobilizzato. Il TSH biotinilato, aggiunto in un secondo step di incubazione, interagisce con i recettori TSH immobilizzati che non sono stati bloccati dai TRAb legati del siero del paziente, dei calibratori e dei controlli. La quantità di TSH biotinilato legata alla piastra è quindi determinata in un terzo step di incubazione con l'aggiunta di streptavidina-perossidasi, che si lega specificamente alla biotina. L'eccesso non legato di streptavidina-perossidasi è quindi lavato via e l'aggiunta di TMB-substrate provoca una colorazione blu. La reazione è stoppata dall'aggiunta della Stop Solution che causa il viraggio della colorazione dal blu al giallo. L'assorbanza è letta a 450 nm con un lettore di piastre ELISA. Una assorbanza più bassa indica la presenza dei TRAb nel campione poiché TRAb inibisce il legame del TSH biotinilato al recettore TSH adsorbito sui pozzetti della piastra. La concentrazione degli anticorpi TRAb è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (4 flaconi, 1mL ciascuno)

CAL1	**REF DCE002/8507-0**
CAL2	**REF DCE002/8508-0**
CAL3	**REF DCE002/8509-0**
CAL4	**REF DCE002/8510-0**

2. Controlli (2 flaconi, 1mL ciascuno, pronti all'uso)

Negative Control	**REF DCE045/8501-0**
Positive Control	**REF DCE045/8502-0**

3. TSH biotin (3 flaconi, liofilizzati) **REF DCE019/8519-0**
4. TSH biotin buffer (1 flacone, 15 mL) **REF DCE047/8547-0**
5. 20X Conc. Streptavidin-Peroxidase (1 flacone, 0,75 mL) **REF DCE041/8541-0**
6. Streptavidin-Peroxidase Diluent (1 flacone, 15 mL) **REF DCE048/8548-0**
7. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)
TSH adsorbito su micropiastra **REF DCE002/8503-0**
8. Start Buffer (1 flacone, 10 mL) **REF DCE046-0**
9. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL) **REF DCE004/8504-0**
10. Stop Solution (1 flacone, 10 mL)
0.25 M acido solforico **REF DCE005/8505-0**
11. 10X Conc.Wash Solution (1 flacone, 100 mL) **REF DCE006/8506-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.
Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note
Conservare tutti i reattivi a 2÷8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 7 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile 6 mesi a 2-8°C.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN_3) o di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- 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/H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE**: **il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.
  A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'addizione del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'addizione della Stop Solution. L'addizione del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C_1...C_4)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO NIBSC 90/672 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C_1	C_2	C_3	C_4
U/L	1	2	8	40

Una volta aperti i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Il siero dovrebbe essere analizzato subito dopo la separazione o conservato in aliquote a –20°C o a temperature inferiori. Ripetuti scongelamenti e ricongelamenti o alte temperature di stoccaggio devono essere evitati. Lo stoccaggio non corretto può portare a una perdita dell'attività del TRAb.
Non usare campioni di siero lipemici o molto emolitici.
Non utilizzare campioni di plasma per questo kit.
Se necessario, portare i campioni di siero a temperatura ambiente e mescolare per raggiungere l'omogeneità.
I Controlli sono pronti all'uso.

6.3. Preparazione della TSH biotin

Ciascun flacone deve essere ricostituito con 4,5 mL di tampone di ricostituzione (TSH biotin buffer, reagente 4). Se è necessario utilizzare più di un flacone, mischiare insieme i flaconi e mischiare bene.
Conservare a 2-8°C per 6 mesi dopo la ricostituzione.

6.4. Preparazione della Streptavidin Peroxydase

Diluire la Streptavidin peroxydase concentrata 1:20 con "Strepavidin-Peroxidase Diluent" (es. 0,5 mL Streptavidin Peroxidase concentrata (20X) + 9.5 mL di Streptavidine Peroxidase Diluent).
Conservare a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit.

6.5. Preparazione della Wash Solution

Preparare una quantità sufficiente di wash solution diluendo la 10X Wash Solution Concentrata 1+9 con acqua distillata o deionizzata. Per esempio, diluire 50 mL della soluzione concentrata con 450 mL di acqua distillata. La soluzione non deve presentare cristalli prima della diluizione; eventualmente dissolvere i cristalli scaldando al max a 37°C. La soluzione diluita può essere conservata a 2-8°C fino a 30 giorni.

6.6. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C_1-C_4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controlli	Bianco
Start buffer	**75 µL**	**75 µL**	
Calibratori	**75 µL**		
Campione /Controlli		**75 µL**	
Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare 120 minuti a temperatura ambiente (22-28°C) agitando a >500 rpm. Alternativamente incubare senza agitazione per almeno 180 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare aggiungendo in ogni pozzetto 300 µL di soluzione di lavaggio diluita, allontanare completamente la soluzione.			
TSH Biotin	**100 µL**	**100 µL**	
Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 25 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare aggiungendo in ogni pozzetto 300 µL di soluzione di lavaggio diluita, allontanare completamente la soluzione			
Streptavidin-Peroxidase	**100 µL**	**100 µL**	
Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare aggiungendo in ogni pozzetto 300 µL di soluzione di lavaggio diluita; ripetere il lavaggio altre 2 volte allontanando completamente la soluzione.			
TMB Substrate	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Coprire la piastra e incubarla 30 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	**50 µL**	**50 µL**	**50 µL**
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio d'analisi dovrebbe stabilire il suo proprio margine di riferimento per livelli normali e patologici di TRAb.
I dati riportati in questa metodica sono da considerarsi solo come valori guida. Si raccomanda anche ad ogni laboratorio di testare i propri controlli insieme ai controlli provvisti in questo kit.

8. RISULTATI

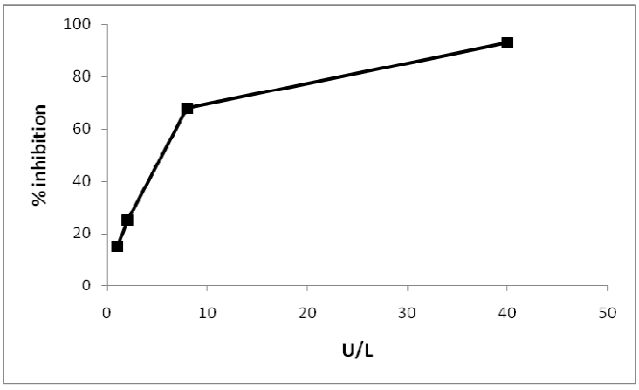
8.1. Curva di calibrazione

La curva di calibrazione viene stabilita tracciando la concentrazione dei Calibratori sull'asse delle x (scala logaritmica) contro l'assorbanza dei calibratori sull'asse y (scala lineare). Le concentrazioni di TRAb nel siero dei pazienti può quindi essere estrapolata dalla curva di calibrazione. Possono essere utilizzati anche altri sistemi di riduzione dei dati. I risultati possono anche essere espressi come inibizione percentuale (% I) del legame di TSH calcolato secondo la formula:

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (D1) absorbance 450 nm}}\right)$$

I campioni con elevate concentrazioni di TRAb possono essere diluiti con il Controllo Negativo del kit. Per esempio, aggiungere 20 µL di campione a 180 µL di Controllo Negativo per ottenere una diluizione 10x. Da una diluizione 10x (o altro a seconda dei casi) possono essere preparate altre diluizioni (100x per esempio). Alcuni sieri non si diluiscono in modo lineare; in questo caso suggeriamo di utilizzare, per il calcolo della concentrazione di TRAb, la diluizione che dà un valore vicino al 50% di inibizione.
Risultati tipici (solo d'esempio, da non utilizzare per il calcolo di altri dosaggi)

Sample	A450	% Inhibition	U/L
Control D1	2.00	0	0
C1	1.70	15	1
C2	1.50	25	2
C3	0.65	68	8
C4	0.15	93	40
Control D2	1.26	37	3.5



8.2. Valori di riferimento

TSH Receptor Ab	
negativo	≤ 1.0 U/L
Zona grigia	1.1 – 1.5 U/L
positivo	> 1.5 U/L

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

9. PARAMETRI CARATTERISTICI

9.1. Specificità clinica

154 campioni di pazienti sani sono stati valutati con il kit TSH Receptor Ab Diametra: 152 campioni (99%) sono stati identificati come negativi.

9.2. Sensibilità clinica

50 campioni da pazienti con diagnosi di Graves sono stati analizzati utilizzando il kit TSH Receptor Ab ELISA.
49 (98%) sono stati identificati come positivi per autoanticorpi anti-recettore del TSH.
1 campione (2%) è stato identificato come all'interno del range dubbio.

9.3. Limite di rilevazione

Il limite di rilevazione è stato calcolato considerando la media e la deviazione standard del dosaggio del controllo negativo del kit replicato 32 volte; il limite di rivelazione considerando 2 standard deviations è 0.21 U/mL.

9.4. Intra e inter assay

9.4.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando 16 volte due diversi sieri con valori situati dentro il range di lavoro della curva di calibrazione. La variabilità intra-assay è ≤ 7,6%

9.4.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando la misura di un siero di controllo con kit appartenenti a lotti diversi e/o con diverse combinazioni di lotti di reagenti. La variabilità inter-assay è ≤ 6,5%.

9.5. Accuratezza clinica

Sono state testate le seguenti sostanze interferenti: emoglobina (5 mg/mL), bilirubina (20 mg/dL), intralipidi (10 mg/mL); nessuna di queste sostanze ha dato interferenza nel dosaggio.

9.6. Interferenze

L'analisi di sieri di pazienti con patologie autoimmuni diverse da Patologia di Graves non ha rilevato interferenze da parte di anticorpi per: tireoglobulina, perossidasi tiroidea, acido glutammico decarbossilasi,

idrolasi 21, recettore dell'acetilcolina, dsDNA e fattore reumatoide.

10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. J. Bolton et al Measurement of thyroid stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA Clin. Chem 1999 45: 2285-2287
2. K Kamijo TSH receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor Endocrine Journal 2003 50:113-116
3. B. Rees Smith et al A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies Thyroid 2004 14: 830-835

Ed. 01/2015 **DCM085-7**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM085-7
Ed. 01/2015

TSH RECEPTOR Ab

for routine analysis

Quantitative determination of thyrotropin receptor autoantibodies (TRAb) in human serum

IVD | **LOT** See external label | 2°C 8°C | Σ = 96 tests | **REF DKO085**

INTENDED USE

TSH Receptor Ab (TRAb) ELISA kit is intended for use by professional persons only for the quantitative determination of thyrotropin receptor autoantibodies in human serum.
TSH Receptor Ab kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The hyperthyroidism is a disease that produce an increase in blood circulating levels of thyroid hormones. In some cases, as in Graves' disease is caused by autoantibodies against the TSH receptor (TSHr). Autoantibodies mimic the effect of TSH on the thyroid gland causing a rise in blood levels of T3 and T4. The determination of these autoantibodies (TRAb) may be useful for the diagnosis of the disease and its treatment. The main treatment for Graves' disease is represented by use of antithyroid drugs (propylthiouracil or methimazole), I^{131} and surgery. The dosage of TRAb is therefore useful in the course or at the end of therapy.

2. PRINCIPLE

In TSH Receptor Ab (TRAb) ELISA kit the TSH receptor autoantibodies in the patient sera, calibrators and controls are allowed to interact with TSH receptor coated into ELISA plate wells. After a 2 hours incubation, the samples are discarded leaving TRAb bound to the immobilized TSH receptor. TSH Biotin, added in a 2nd incubation step, interacts with the immobilized TSH receptors, which have not been blocked by the bound TRAb from patient sera, calibrators or controls.
The amount of TSH Biotin bound to the plate is then determined in a third incubation step by addition of streptavidin peroxidase, which binds specifically to biotin. Excess unbound streptavidin peroxidase is then washed away and the addition of tetramethylbenzidine (TMB) substrate results in formation of a blue colour.
This reaction is stopped by the addition of stop solution causing the well contents to turn from blue to yellow. The absorbance of the yellow reaction mixture at 450nm is then read using an ELISA plate reader. A lower absorbance indicates the presence of TRAb in the test sample as TRAb inhibits the binding of TSH biotin to TSH receptor coated plate wells.
The concentration of thyrotropin receptor autoantibodies in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (4 vials, 1 mL each)

CAL1	**REF DCE002/8507-0**
CAL2	**REF DCE002/8508-0**
CAL3	**REF DCE002/8509-0**
CAL4	**REF DCE002/8510-0**

2. Controls (2 vials, 1mL each, ready to use)

Negative Control	**REF DCE045/8501-0**
Positive Control	**REF DCE045/8502-0**

3. TSH biotin (3 vials, lyophilized) **REF DCE019/8519-0**
4. TSH biotin buffer (1 vial, 15 mL) **REF DCE047/8547-0**
5. 20X Conc. Streptavidin-Peroxidase (1 vial, 0.75 mL) **REF DCE041/8541-0**
6. Streptavidin-Peroxidase Diluent (1 vial) 15 mL **REF DCE048/8548-0**
7. Coated Microplate (1 breakable microplate)
Microplate coated with TSH receptor **REF DCE002/8503-0**
8. Start Buffer (1 vial, 10 mL) **REF DCE046-0**
9. TMB Substrate (1 vial, 15 mL) **REF DCE004/8504-0**
10. Stop Solution (1 vial, 10 mL)
0.25 M sulfuric acid **REF DCE005/8505-0**
11. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 100 mL) **REF DCE006/8506-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled or deionized water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.
Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2÷8°C in the dark.
Open the bag of reagent 7 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to 6 months at 2-8°C.

4. 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.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- 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 contain small amounts of Sodium Azide (NaN_3) or Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be 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 and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. 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. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as 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.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.
  For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
- 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 lipemeic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of Calibrators (C_1...C_4)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO NIBSC 90/672 and have the following concentration:

	C_1	C_2	C_3	C_4
U/L	1	2	8	40

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

The sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at –20°C or below.
Repeated freeze thawing or increases in storage temperature must be avoided.
Incorrect storage of serum samples can lead to loss of TRAb activity. Do not use higly lipaemic or haemolysed serum samples. Do not use plasma in the assay. When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity.
The Controls are ready to use.

6.3. Preparation of the TSH biotin

Reconstitute each vial with 4.5 mL of TSH Biotin buffer (reagent 4).
When more than one vial is to be used, pool the vials and mix gently before use.
Store at 2-8°C for up to 6 months after reconstitution.

6.4. Preparation of the Streptavidin Peroxydase

Dilute the Streptavidin Peroxidase 1:20 with Streptavidin Peroxydase Diluent (for example, 0.5 mL of Streptavidin-Peroxidase 20X concentrate + 9.5 mL of Streptavidin-Peroxidase Diluent).
Store at 2-8°C for up to the expiry date of the kit.

6.5. Preparation of the Wash Solution

Prepare a sufficient amount of washing solution by diluting the 10X Concentrated Wash Solution 1 + 9 with distilled or deionized water. For example, dilute 50 mL of the Concentrate Wash with 450 mL of distilled water. The solution should be free of crystals before dilution, otherwise dissolve by warming up to max 37°C. The diluted washing solution can be stored at 2-8°C up to 30 days.

6.6. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid 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 (C_1-C_4), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagents	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Start buffer	**75 µL**	**75 µL**	
Calibrator	**75 µL**		
Sample or Controls		**75 µL**	
Cover the plate and incubate 120 minutes at room temperature (22-28°C) while shaking at >500 rpm. Alternatively incubate without shaking for at least 180 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well and wash the wells with 300 µL of diluted Wash Solution, drain the wash completely.			
TSH Biotin	**100 µL**	**100 µL**	
Cover the plate and incubate 25 minutes at room temperature (22-28°C) Remove the contents from each well and wash the wells with 300 µL of diluted Wash Solution, drain the wash completely.			
Streptavidin-Peroxidase	**100 µL**	**100 µL**	
Cover the plate and incubate 20 minutes at room temperature (22-28°C) Remove the contents from each well and wash the wells with 300 µL of diluted Wash Solution. Repeat the washing procedure other two times by draining the wash completely.			
TMB Substrate	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Incubate at room temperature (22-28°C) for 30 minutes in the dark.			
Stop Solution	**50 µL**	**50 µL**	**50 µL**
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

It is recommended that each laboratory include its own panel of control samples in the assay. Each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for TRAb levels.

8. RESULTS

8.1. Calibration curve

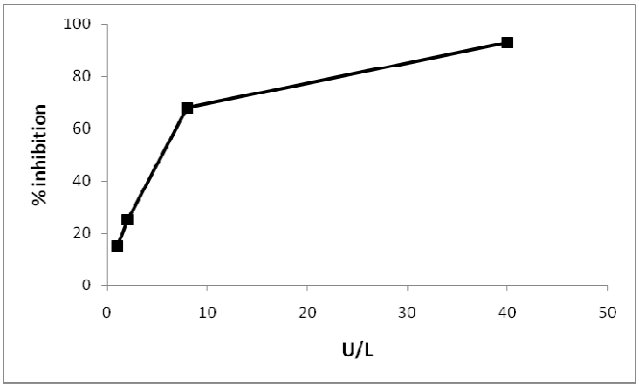
A calibration curve can be established by plotting calibrator concentration on the x-axis (log scale) against the absorbance of the calibrators on the y-axis (linear scale). The TRAb concentrations in patient sera can then be read off the calibration curve. Other data reduction systems can be used. Results can also be expressed as inhibition (%I) of TSH binding calculated using the formula;

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (D1) absorbance 450 nm}}\right)$$

Samples with high TRAb concentrations can be diluted in kit negative control (D1). For example, 20 µL of sample plus 180 µL of negative control to give a 10x dilution. Other dilutions (e.g. 100x) can be prepared from a 10x dilution or otherwise as appropriate. Some sera will not dilute in a linear way and we suggest that the dilution giving a value closest to 50% inhibition is used for calculation of TRAb concentration.

Typical Results (example only, not for use in calculation of actual results)

Sample	A450	% Inhibition	U/L
Control D1	2.00	0	0
C1	1.70	15	1
C2	1.50	25	2
C3	0.65	68	8
C4	0.15	93	40
Control D2	1.26	37	3.5



8.2. Reference Values

TSH Receptor Ab	
Negative	≤ 1.0 U/L
Grey zone	1.1 – 1.5 U/L
Positive	> 1.5 U/L

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacurer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

9.1. Clinical Specificity

154 samples from healthy blood donors were assayed in the TSH Receptor Ab ELISA kit. 152 (99%) were identified as being negative for TSH Receptor autoantibodies.

9.2. Clinical Sensitivity

50 samples from patients diagnosed with Graves'disease were assayed using the TSH Receptor Ab ELISA kit.
49 (98%) were identified as being positive for TSH Receptor autoantibodies.
1 sample (2%) was identified as being within the equivocal range.

9.3. Lower Detection Limit

The kit negative control was assayed 32 times and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at 2 standard deviations was 0.21 U/mL.

9.4. Intra and inter-assay variations

9.4.1 Intra-Assay

Within run variation was determined by replicate 16 times two different sera with values in the range of calibration curve. The within assay variability is ≤ 7.6%

9.4.2 Inter-Assay

Between run variation was determined by replicate the measurements of one control serum with different lots of kits and/or different mix of lots of reagents. The between assay variability is ≤ 6.5%.

9.5. Clinical Accuracy

Analysis of sera from patients with autoimmune diseases other than Graves'disease indicated non interference from autoantibodies to: thyroglobulin, thyroid peroxidise, glutamic acid decarboxylase, 21-hydroxylase, acetylcholine receptor, dsDNA or from rheumatoid factor.

9.6. Interference

No interference was observed when samples were spiked with the following materials: haemoglobin (5 mg/mL), bilirubin (20 mg/dL), intralipid (10 mg/mL).

10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. J. Bolton et al Measurement of thyroid stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA Clin. Chem 1999 45: 2285-2287
2. K Kamijo TSH receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor Endocrine Journal 2003 50:113-116
3. B. Rees Smith et al A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies Thyroid 2004 14: 830-835

Ed. 01/2015 **DCM085-7**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

CE

DiaMetra
care for quality

DCM085-7
Ed. 01/2015

TSH RECEPTOR Ab

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa de autoanticuerpos contra receptores de tirotropina (TRAb) en suero humano

IVD | **LOT** Vease la etiqueta externa | 2°C 8°C | Σ = 96 ensayos | **REF DKO085**

USO PREVISTO

El ensayo ELISA de autoanticuerpos contra el receptor TSH se utiliza a nivel profesional para la determinación cuantitativa de los autoanticuerpos específicos de receptores de tirotropina en suero humano.
El kit TSH Receptor Ab está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLINICA

El hipertiroidismo provoca un aumento en el nivel de hormonas tiroideas circulantes. En algunos casos, como en la enfermedad de Graves, la causa son los autoanticuerpos contra el receptor TSH. Los autoanticuerpos imitan el efecto del TSH sobre la tiroides provocando el aumento del nivel de T3 y T4 en la sangre. La determinación de estos autoanticuerpos (TRAb) puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. El tratamiento principal de la enfermedad de Graves consiste en el empleo de fármacos antitiroideos (propiltiouracilo o metimazol), del I^{131} y en la cirugía. Determinar la cantidad de autoanticuerpos TR es de utilidad tanto durante la terapia como una vez concluida la misma.

2. PRINCIPIO

En el ensayo ELISA TRAb, los autoanticuerpos anti-receptor TSH presentes en el suero del paciente, en los calibradores y controles, reaccionan con el receptor TSH fijado en los pocillos de la placa. Tras 2 horas de incubación, se eliminan las muestras, dejando los TRAb ligados al receptor TSH. En la segunda fase de incubación se añade el conjugado TSH biotinilado, que reacciona con los receptores TSH inmovilizados que no fueron bloqueados por los TRAb ligados del suero del paciente, calibradores y controles. La cantidad de TSH biotinilado ligado a la placa se determina en una tercera fase de incubación con el añadido de estreptavidina-peroxidasa, que se liga específicamente a la biotina. El exceso de estreptovidina-peroxidasa no ligada se elimina mediante lavado y se añade el sustrato TMB (tetrametilbenzidina), que da lugar a la formación de un color azul. Se detiene la reacción agregando la solución de parada que modifica el color de azul a amarillo. A continuación se lee la absorbancia a 450 nm con un lector de placas ELISA. Una absorbancia escasa denuncia la presencia de TRAb en la muestra, puesto que los TRAb inhiben el ligado del TSH-biotinilado al receptor TSH fijado en los pocillos de la placa.

3. REACTIVOS, MATERIALES Y INSTRUMENTOS

3.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (4 frascos, 1 mL cada uno)

CAL1	**REF DCE002/8507-0**
CAL2	**REF DCE002/8508-0**
CAL3	**REF DCE002/8509-0**
CAL4	**REF DCE002/8510-0**

2. Controles (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control Negativo	**REF DCE045/8501-0**
Control Positivo	**REF DCE045/8502-0**

3. TSH Biotina (3 frascos, liofilizados) **REF DCE019/8519-0**
4. Diluyente Biotina (1 frascos, 15 mL) **REF DCE047/8547-0**
5. Estreptavidina-peroxidasa conc. 20X (1 frasco, 0.75 mL) **REF DCE041/8541-0**
6. Estreptavidina-peroxidasa diluent (1 frasco, 15 mL) **REF DCE048/8548-0**
7. Microplaca ricubierta (1 microplaca divisible) Microplaca con TSH adsorbido) **REF DCE002/8503-0**
8. Tampón de inicio (1 frasco, 10 mL) **REF DCE046-0**
9. Solución substrato (1 frasco, 15 mL) **REF DCE004/8504-0**
10. Solución de lavado conc 10X (1 frasco, 100 mL) **REF DCE006/8506-0**
11. Solución de parada (1 frasco, 10 mL) Ácido sulfúrico 0,25M **REF DCE005/8505-0**

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada o desionizada.

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos.
Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

Notas
Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 ºC.
Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 7 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; *una vez abierta, permanece estable hasta 6 meses.*

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los Calibradores y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores y los controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio (NaN_3) o Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- **ATENCIÓN**: **se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos**; se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la fluídica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteinización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el substrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.

- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C_1….C_4)

Los Calibradores son listos para usar, se calibraron frente a la preparación de referencia WHO NIBSC 90/762 y tienen las siguientes concentraciones:

	C_1	C_2	C_3	C_4
U/L	1	2	8	40

Una vez abiertos, los Calibratores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación de la muestra

El suero debería analizarse inmediatamente después de la separación; de lo contrario, se conserva dividido en alícuotas a –20°C o temperaturas aún más bajas.
Evítese descongelar y congelar repetidamente las muestras, como así la conservación a temperaturas más altas de la indicada. Una conservación incorrecta puede llevar a una pérdida de la actividad del TRAb.
No utilizar muestras de suero lipémicas o muy hemolizadas.
No utilizar muestras de plasma para este ensayo.
Cuando sea necesario, atemperar las muestras de suero a temperatura ambiente y mezclar para homogeneizar.

6.3. Preparación del TSH biotina

Reconstituir cada frasco con 4,5 mL de tampón de reconstitución (Diluyente Biotina, reactivo 4).
Una vez reconstituido, el preparado se conserva 6 meses a 2-8°C.

6.4. Preparación de la estreptavidina-peroxidasa

Diluir en proporción 1:20 con el diluyente específico (ejemplo: 0,5 mL de estreptavidina-peroxidasa concentrada + 9.5 mL de diluyente).
El preparado se conserva hasta la fecha de caducidad del kit.

6.5. Preparación de la solución de lavado

Preparar una cantidad suficiente de solución de lavado diluyendo el tampón concentrado en proporción de 1:10 con agua destilada o desionizada.
Por ejemplo, diluir 50 mL de solución concentrada en 450 mL de agua destilada. Antes de la dilución, la solución no debe presentar cristales; si fuera necesario, disolverlos calentando el producto hasta un máximo de 37ºC. La solución diluida se conserva hasta la fecha de caducidad del kit a 2-8°C.

6.6. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_1-C_4), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	**Calibradores**	**Muestras/ Controles**	**Blanco**
Tampon de inicio	**75 µL**	**75 µL**	
Calibradores C_1-C_4	**75 µL**		
Muestras/ Controles		**75 µL**	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 120 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) agitando > 500 rpm. En alternativa, incubar sem agitar durante pelo menos 180 minutos à temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos con 0,3 mL de de solución de lavado diluida. Retirar la mezcla de reacción.			
TSH Biotina	**100 µL**	**100 µL**	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 25 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos con 0,3 mL de de solución de lavado diluida. Retirar la mezcla de reacción.			
Estreptavidina peroxidasa	**100 µL**	**100 µL**	
Sellar la placa con la película plástica e incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22-28°C) agitando. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de agua destilada. Retirar la mezcla de reacción.			
Substrato	**100 µL**	**100 µL**	**100 µL**
Cubrir la placa e incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida da la lux			
Solución de parada	**50 µL**	**50 µL**	**50 µL**
Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Se aconseja que cada laboratorio establezca su propio margen de referencia para niveles normales y patológicos de TRAb.
Los datos expuestos en estas instrucciones deben considerarse sólo indicativos. Se aconseja que cada laboratorio analice sus propios controles junto con los controles de este kit.

8. RESULTADOS

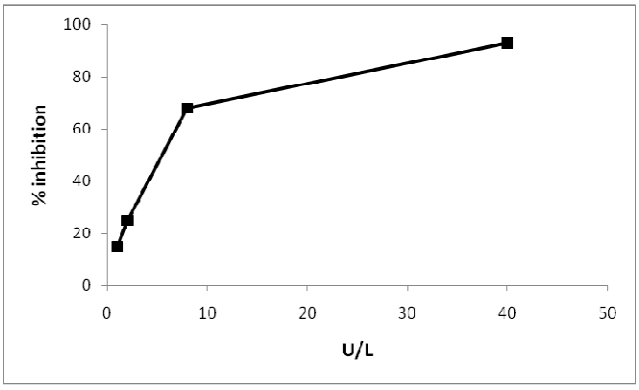
8.1. Curva de calibración

La curva de calibración se establece mediante el trazado de la concentraciónde las normas sobre la x (escala logarítmica) en contra de la absorción de los calibradores en el eje Y (escala lineal).
Las concentraciones de TRAb en el suero de los pacientes pueden ser extrapolados a partir de la curva de calibración. Pueden ser utilizados otros sistemas de reducción de datos. Los resultados también se puede expresar como la inhibición porcentaje (% I) de la unión de TSH calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (D1) absorbance 450 nm}}\right)$$

Las muestras con altas concentraciones de TRAB se puede diluir con el control negativo del kit. Por ejemplo, añadir 20 µL de la muestra a 180 µL de control negativo para obtener una dilución de 10 veces. A partir de una dilución de 10 veces (o en su caso) se pueden preparar otras diluciones (por ejemplo, 100x). Algunos sueros no se diluyen en una forma lineal, en este caso, sugerimos que utilice para el cálculo de la concentración de TRAb, la dilución que da un valor cercano a 50% de inhibición.
Los resultados típicos (sólo un ejemplo, no se utilizará para el cálculo de los puntos fuertes de otro tipo):

Muestra	A450	% Inhibicion	U/L
Control D1	2.00	0	0
S1	1.70	15	1
S2	1.50	25	2
S3	0.65	68	8
S4	0.15	93	40
Control D2	1.26	37	3.5



8.2. Valores de referencia

TRAb	
negativo	≤ 1.0 U/mlL
incierto	1.1 - 1.5 U/mL
positivo	> 1.5 U/mL

Los valores de los Calibradores y los controles indicados son sólo un ejemplo de una Curva de calibración típica.

9. C ARACTERÍSTICAS

9.1. Especificidad clínica

154 muestras de pacientes sanos fueron evaluados con el Diámetro TRAb kit: 152 muestras (99%) fueron identificados como negativos.

9.2. Sensibilidad clínica

50 muestras de pacientes con diagnóstico de Graves fueron analizados utilizando el kit TRAb.
49 (98%) fueron identificados como positivos para anticuerpos anti-receptor de TSH.
Una muestra (2%) se identificó como dentro del rango de equívocos.

9.3. Límites de detección

La sensibilidad analítica se establece en 0,21 U/mL.

9.4. Variación intra y entre ensayos

9.4.1 *Intra-Assay*

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) dos niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es ≤ 7.6%.

9.4.*2 Inter-Assay*

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es ≤ 6.5%.

9.5. Precisión clínica

Se probaron las siguientes sustancias que interfieren: hemoglobina (5 mg/mL), la bilirrubina (20 mg/dL), Intralipid (10 mg/mL); ninguna de estas sustancias le dio la interferencia en el ensayo.

9.6. Interferencia

El análisis de los sueros de pacientes con otras enfermedades autoinmunes no detectar la interferencia de anticuerpos contra la tiroglobulina, peroxidasa tiroidea, la decarboxilasa del ácido glutámico, hidrolasa 21, receptor, DNA de doble cadena y el factor reumatoide.

10. ELIMINACIÓN DE RESIDUO

Los reactivos deben desecharse de acuerdo con las normativas locales.

BIBLIOGRAFÍA

- J. Bolton et al Measurement of thyroid stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA Clin. Chem 1999 45: 2285-2287
- K Kamijo TSH receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor Endocrine Journal 2003 50:113-116
- B. Rees Smith et al A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies Thyroid 2004 14: 830-835

Ed 01/2015 **DCM085-7**

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1

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

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers

insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run

- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)

- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS

No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del substrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS

Aucune réaction colorimétrique de l'essai

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs