



DiaMetra



TSH RECEPTOR AUTOANTIBODY

per analisi di routine

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

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO085

DESTINAZIONE D'USO

TSH receptor autoantibody (TRAb) ELISA è un test ad uso professionale per la determinazione quantitativa degli autoanticorpi specifici del recettore tirotropina in siero umano.

Il kit TRAb ELISA 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 I¹³¹ e dalla chirurgia. Il dosaggio del TRAb risulta quindi utile anche in corso o al termine della terapia.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel TRAb ELISA gli autoanticorpi specifici del recettore TSH presenti nel siero dei pazienti, i calibratori e i 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.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- TSH Receptor Standards (4 flaconi, 1mL ciascuno)
STD1 **REF** DCE002/8507-0
STD2 **REF** DCE002/8508-0
STD3 **REF** DCE002/8509-0
STD4 **REF** DCE002/8510-0
- Controlli (2 flaconi, 1mL ciascuno, pronti all'uso)
Negative Control **REF** DCE045/8501-0
Positive Control **REF** DCE045/8502-0
- TSH biotin (3 flaconi, liofilizzati)
REF DCE019/8519-0
- TSH biotin buffer (1 flacone, 15 mL)
REF DCE047/8547-0
- 20X Conc. Streptavidin Peroxidase (1 flacone, 0,75 mL)
REF DCE041/8541-0
- Streptavidin-Peroxidase Diluent (1 flacone, 15 mL)
REF DCE048/8548-0
- Coated Microplate
(1 micropiastra breakable con TSH adsorbito)
REF DCE002/8503-0
- Start Buffer (1 flacone, 10 mL)
REF DCE046-0
- TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
REF DCE004/8504-0
- 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 100 mL)
REF DCE006/8506-0
- Stop Solution (1 flacone, 10 mL)
0.25 M acido solforico **REF** DCE005/8505-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm).

Note

Dopo l'apertura, mantenere i pozzetti non utilizzati nel pacchetto originale (chiuso con nastro adesivo) e

nella busta di plastica con l'essiccante fornito.
Conservare a 2-8°C e utilizzare entro 6 mesi.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione degli standard e dei controlli 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, gli Standards e 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.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate.
- 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'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta 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. Concentrazione degli Standard (S₁, S₂, S₃, S₄)

Gli standard sono calibrati contro il WHO NIBSC 90/672 e hanno approssimativamente le seguenti concentrazioni:

	S1	S2	S3	S4
U/L	1	2	8	40

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. Se è necessario utilizzare più di un flacone, mischiare insieme i flaconi e mischiare bene.

Conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$ per 6 mesi dopo la ricostituzione.

6.4. Preparazione della Streptavidin Peroxidase

Diluire 1:20 con "Streptavidin Peroxidase Diluent" (es. 0,5 mL Streptavidin Peroxidase concentrata (20X) + 9.5 mL di Streptavidine Peroxidase Diluent).

Conservare a $2-8^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza del kit.

6.5. Preparazione della Wash Solution

Preparare una quantità sufficiente di wash solution diluendo la wash solution concentrata 1:10 con acqua distillata o deionizzata. Per esempio, diluire 50 mL della soluzione concentrata con 450 mL di acqua distillata. La soluzione prima della diluizione deve essere senza cristalli, altrimenti dissolvere i cristalli presenti scaldando al max a 37°C . La soluzione diluita può essere conservata a $2-8^{\circ}\text{C}$ fino alla data di scadenza del kit.

6.6. Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) per al meno 30 minuti.

Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (S_1-S_4), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione o Controlli	Bianco
Start buffer	75 μL	75 μL	
Standard	75 μL		
Campione o Controlli		75 μL	

Coprire la piastra con la pellicola di plastica e incubare 120 minuti a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$) agitando a >500 rpm. Alternativamente incubare senza agitazione per almeno 180 minuti a temperatura ambiente ($22-28^{\circ}\text{C}$).
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 ($22-28^{\circ}\text{C}$). 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 ($22-28^{\circ}\text{C}$). 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 ($22-28^{\circ}\text{C}$).			
Stop Solution	50 μL	50 μL	50 μL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm azzerando con il Bianco entro 20 min dopo l'aggiunta della stop solution			

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 Standard

La curva di calibrazione viene stabilita tracciando la concentrazione degli standards 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:

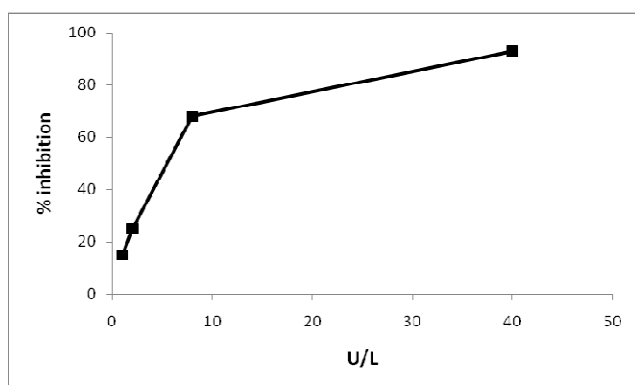
$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (D1) absorbance 450 nm}} \right)$$

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

anti-TRAb	
negativo	≤ 1.0 U/L
Zona grigia	1.1 – 1.5 U/L
positivo	> 1.5 U/L

NB: I valori sopra riportati sono da considerare solo come un'indicazione.

9. PARAMETRI CARATTERISTICI

9.1. Clinical Specificity

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

9.2. Clinical Sensitivity

50 campioni da pazienti con diagnosi di Graves sono stati analizzati utilizzando il kit di TRAb 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 standard. 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

- 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. 02/2011

DCM085-5

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595
Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana
06034 FOLIGNO (PG) Italy
Tel. 0039-0742-24851
Fax 0039-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DiaMetra



TSH RECEPTOR AUTOANTIBODY

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

TRAb ELISA 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 TRAb ELISA TSH receptor autoantibodies 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 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.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- TSH Receptor Standards (4 vials, 1 mL each)
 - STD1 **REF** DCE002/8507-0
 - STD2 **REF** DCE002/8508-0
 - STD3 **REF** DCE002/8509-0
 - STD4 **REF** DCE002/8510-0
- Controls (2 vials, 1mL each, ready to use)
 - Negative Control **REF** DCE045/8501-0
 - Positive Control **REF** DCE045/8502-0
- TSH biotin (3 vials, lyophilized) **REF** DCE019/8519-0
- TSH biotin buffer (1 vial, 15 mL) **REF** DCE047/8547-0
- 20X Conc. Streptavidin-Peroxidase (1 vial, 0.75 mL) **REF** DCE041/8541-0
- Streptavidin-Peroxidase Diluent (1 vial) 15 mL **REF** DCE048/8548-0
- Coated Microplate
(1 breakable microplate coated with TSH receptor) **REF** DCE002/8503-0
- Start Buffer (1 vial, 10 mL) **REF** DCE046-0
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL) **REF** DCE004/8504-0
- 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 100 mL) **REF** DCE006/8506-0
- Stop Solution (1 vial, 10 mL)
0.25 M sulfuric acid **REF** DCE005/8505-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled or deionized water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm)

Note

After opening, return any unused wells to the original foil packet and seal. Then place foil bag in the self-seal plastic bag with desiccant provided. Store at 2-8°C for up to 6 months.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- All human source material used in the preparation of standards and controls for this product 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, the Standard and the 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 (NaN₃) 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/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
- 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 dates printed on the labels of the box and of the vials 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 is your 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 should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Standard (S₁,S₂,S₃,S₄) Concentration

The standard calibrated against the WHO NIBSC 90/672 have approximatively the following concentration:

	S1	S2	S3	S4
U/L	1	2	8	40

6.2. Preparation of the Sample

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 highly 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 TSH Biotin buffer. 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 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 expiry date of the kit.

6.5. Preparation of the Wash Solution

Prepare a sufficient amount of washing solution by diluting the concentrated wash buffer 1:10 with distilled or de-ionized water. For example, dilute 50 mL of the concentrate 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 expiry date of the kit.

6.6. Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes. As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each of the four points of the standard curve (S₁-S₄), two for each sample, one for Blank.

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 Blank within 20 min after adding the stop solution.			

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. Standard 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 (%) of TSH binding calculated using the formula;

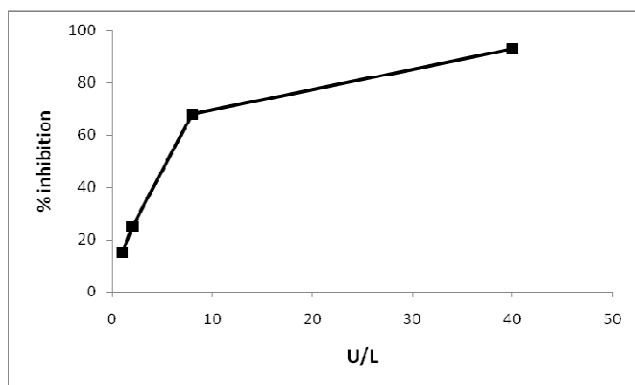
$$100 \times \left(1 - \frac{\text{test sample absorbance at 450 nm}}{\text{negative control (D1) absorbance 450 nm}} \right)$$

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

Reagents	Standard	Sample or Controls	Blank
Start buffer	75 µL	75 µL	
Standard	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.			



8.2. Reference values

anti-TRAb	
negative	≤ 1.0 U/L
Grey zone	1.1 – 1.5 U/L
positive	> 1.5 U/L

NB: The above mentioned reference values provide only a guide.

9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

9.1. Clinical Specificity

154 samples from healthy blood donors were assayed in the TRAb 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 TRAb 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 standard 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 peroxidase, 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

- 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. 02/2011

DCM085-5

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufactory: Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana

06034 FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli











GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los simbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos simbolos

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Establa hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB 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 GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ESCodigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB 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 GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

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% intra-assy 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