



Instructions for Use

TSH Receptor Autoantibody ELISA

IVD



REF EIA-3369

 96



DRG 

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

Distributed by:

DRG 

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

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.
Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

| | | |
|----|---|----|
| 1 | INTENDED USE..... | 3 |
| 2 | REFERENCES / LITERATURE..... | 3 |
| 3 | ASSAY PRINCIPLE | 3 |
| 4 | STORAGE AND PREPARATION OF SERUM SAMPLES | 3 |
| 5 | MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED | 3 |
| 6 | PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED | 4 |
| 7 | ASSAY PROCEDURE | 5 |
| 8 | RESULT ANALYSIS..... | 5 |
| 9 | ASSAY CUT OFF | 6 |
| 10 | CLINICAL EVALUATION | 6 |
| 11 | SAFETY CONSIDERATIONS | 7 |
| 12 | ASSAY PLAN..... | 8 |
| | | |
| 1 | USO INTESO | 9 |
| 2 | BIBLIOGRAFIA | 9 |
| 3 | PRINCIPIO DEL TEST..... | 9 |
| 4 | MAGAZZINAGGIO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DEI SIERI..... | 9 |
| 5 | MATERIALI RICHIESTI MA NON CONTENUTI NEL KIT | 9 |
| 6 | REAGENTI FORNITI..... | 10 |
| 7 | ATTUAZIONE DEL TEST | 11 |
| 8 | RILEVAMENTO DEI RISULTATI | 11 |
| 9 | VALORI DI CUT-OFF DEL TEST..... | 12 |
| 10 | CLINICAL EVALUATION | 12 |
| 11 | NORME DI SICUREZZA | 13 |
| | | |
| 1 | FINALIDAD (USO/UTILIZACIÓN) | 14 |
| 2 | REFERENCIAS..... | 14 |
| 3 | FUNDAMENTO DEL ENSAYO | 14 |
| 4 | ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO | 14 |
| 5 | MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS | 15 |
| 6 | PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS | 15 |
| 7 | PROCEDIMIENTO DE ENSAYO | 16 |
| 8 | ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS..... | 16 |
| 9 | ENSAYO DE CORTE..... | 17 |
| 10 | EVALUACIÓN CLÍNICA | 17 |
| 11 | CONSIDERACIONES SOBRE LA SEGURIDAD | 18 |
| 12 | PLAN DEL ENSAYO | 19 |

| | | |
|----|--|----|
| 1 | EINLEITUNG..... | 20 |
| 2 | LITERATUR | 20 |
| 3 | TESTPRINZIP..... | 20 |
| 4 | VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN | 20 |
| 5 | NICHT IM KIT ENTHALTENE ABER ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN..... | 20 |
| 6 | KIT-KOMPONENTEN UND DEREN ZUBEREITUNG..... | 21 |
| 7 | TESTDURCHFÜHRUNG | 22 |
| 8 | ERGEBNISERMITTLUNG | 23 |
| 9 | CUT OFF..... | 23 |
| 10 | KLINISCHE EVALUIERUNG..... | 23 |
| | | |
| | SYMBOLS USED | 25 |

1 INTENDED USE

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

Hyperthyroidism in Graves' disease is due to the presence of autoantibodies to the TSHR and measurement of these autoantibodies can be useful in disease diagnosis and management.

2 REFERENCES / LITERATURE

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

3 ASSAY PRINCIPLE

In TRAb ELISA, TRAb in patients' sera, calibrators and controls are allowed to interact with TSHR coated onto ELISA plate wells. After a 2 hour incubation, the samples are discarded leaving TRAb bound to the immobilised TSHR. TSH Biotin is added in a 2nd incubation step, where it interacts with immobilised TSHR, 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 (SA-POD), which binds specifically to Biotin. Excess unbound SA-POD is then discarded and the addition of the peroxidase tetramethylbenzidine (TMB) substrate results in the 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 450 nm is then read using an ELISA plate reader. A lower absorbance indicates the presence of TRAb in a test sample as TRAb inhibits the binding of TSH biotin to TSHR coated plate wells. The measuring range is 1 – 40 U/L (NIBSC 08/204).

4 STORAGE AND PREPARATION OF SERUM SAMPLES

Sera to be analysed should be assayed soon after separation or stored, preferably in aliquots, at or below –20 °C.

150 µL is sufficient for one assay (duplicate 75 µL determinations).

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 lipaemic or haemolysed serum samples.

Do not use plasma in the assay.

When required, bring test sera to room temperature (20 °C - 25 °C) and mix gently to ensure homogeneity

Centrifuge the serum prior to assay (preferably for 5 minutes at 10-15,000 rpm in a microfuge) to remove any particulate matter. Please do not omit this centrifugation step for sera that are cloudy or contain particulates.

5 MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED

- Pipettes capable of dispensing 50 µL, 75 µL and 100 µL
- Means of measuring out various volumes to reconstitute or dilute reagents
- Pure water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450 nm.
- ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).
- ELISA Plate cover

6 PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED

Store unopened kits and all kit components (A-K) at 2 °C - 8 °C.

| | | |
|-----|---------------|---|
| 1. | A | TSH Receptor Coated Wells 12 breakapart strips of 8 wells (96 in total) in a frame and sealed in foil bag. Allow to stand at room temperature (20 °C - 25 °C) for at least 30 minutes before opening. Ensure wells are fitted firmly into frame provided. After opening return any unused wells to the original foil bag and seal. Then place the foil bag in the self- seal plastic bag with desiccant provided. Store at 2 °C - 8 °C for up to expiry of kit. |
| 2. | B | Start Buffer , 10 mL Ready for use |
| 3. | C1 - 4 | Calibrators 1, 2, 8 and 40 U/L (units are NIBSC 08/204) 4 x 1.0 mL, Ready for use. |
| 4. | D1 | Negative Control , 1.0 mL Ready for use. |
| 5. | D2 | Positive Control (See label for range) 1.0 mL Ready for use. |
| 6. | E | TSH Biotin , 3 vials Lyophilised Reconstitute each vial with 4.5 mL Reconstitution Buffer for TSH Biotin (F). When more than one vial is to be used, pool the vials and mix gently before use. Store at 2 °C - 8 °C for up to expiry of kit. |
| 7. | F | Reconstitution Buffer for TSH Biotin , 15 mL Ready for use. |
| 8. | G | Streptavidin Peroxidase (SA-POD) , 0.75 mL Concentrated. Dilute 1 in 20 with diluent for SA-POD (H). For example, 0.5 mL (G) + 9.5 mL (H). Store at 2 °C - 8 °C for up to expiry of kit. |
| 9. | H | Diluent for SA-POD , 15 mL Ready for use. |
| 10. | I | Peroxidase Substrate (TMB) , 15 mL Ready for use. |
| 11. | J | Concentrated Wash Solution , 100 mL Concentrated. Dilute to 1 liter with pure water before use. Store at 2 °C - 8 °C for up to kit expiry. |
| 12. | K | Stop Solution , 10 mL Ready for use |

7 ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents and test samples to stand at room temperature (20 °C - 25 °C) for at least 30 minutes before use.

A repeating Eppendorf type pipette is recommended for steps 1, 5, 8, 10 and 11.

Duplicate determinations are strongly recommended for test sera, calibrators and controls.

1. Pipette **75 µL** of start buffer (B) into each well to be used, leaving the last well empty for a blank (see step 12).
2. Pipette **75 µL** of test sera, calibrators (C1-4) and controls (D1 and D2) into respective wells (start with the 40 U/L calibrator and descend down the plate to the negative control and then test sera), leaving the last well blank.
3. Cover the frame and shake the wells for 2 hours at room temperature on an ELISA plate shaker (500 shakes per min.).
4. After incubation, aspirate samples by use of a plate washing machine, or discard the samples by briskly inverting the frame of wells over a suitable receptacle. Wash the wells once with diluted wash solution (J), and aspirate the wash by use of a plate washing machine or discard the wash by briskly inverting the frame of wells over a suitable receptacle. Tap the inverted wells gently on a clean, dry, absorbent surface to remove excess wash solution (only necessary if washing plate by hand).
5. Pipette **100 µL** of reconstituted TSH biotin (E) into each well (except blank). Avoid splashing the material out of the wells during addition.
6. Cover the plate, and incubate at room temperature for 25 minutes without shaking.
7. Repeat wash step 4.
8. Pipette **100 µL** of diluted SA-POD (G) into each well (except blank), cover the plate and incubate at room temperature for 20 minutes without shaking.
9. After incubation, aspirate samples by use of a plate washing machine, or discard the samples by briskly inverting the frame of wells over a suitable receptacle. Wash the wells twice with diluted wash solution (J) followed by once with pure water (to remove any foam) and tap the inverted wells gently on a clean, dry, absorbent surface to remove excess wash solution (if a plate washing machine is used, the plate can be washed 3 times with diluted wash solution (J) only).
10. Pipette **100 µL** of TMB (I) into each well (including blank) and incubate in the dark at room temperature for 30 minutes without shaking.
11. Pipette **50 µL** stop solution (K) to each well (including blank), cover the plate and shake for approximately 5 seconds on a plate shaker. Ensure substrate incubations are the same for each well.
12. Within 15 minutes, read the absorbance of each well at 450 nm using an ELISA plate reader, blanked against the well containing **100 µL** of TMB (I) and **50 µL** stop solution (K) only.

8 RESULT ANALYSIS

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 patients' sera can then be read off the calibration curve [plotted at DRG as a spline log/lin curve (smoothing factor = 0)].

The negative control can be assigned a value of 0.1 to assist in computer processing of assay results.

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 (minus blank) | %I | U/L |
|------------------|-----------------------|----|-----|
| Negative Control | 2.00 | 0 | 0 |
| C1 | 1.70 | 15 | 1 |
| C2 | 1.50 | 25 | 2 |
| C3 | 0.65 | 68 | 8 |
| C4 | 0.15 | 93 | 40 |
| Positive Control | 1.26 | 37 | 3.5 |

9 ASSAY CUT OFF

| | <u>U/L</u> |
|-----------|-----------------|
| Negative | ≤ 1 U/L |
| Equivocal | < 1.0 – 1.5 U/L |
| Positive | > 1.5 U/L |

This cut off has been validated at DRG. However each laboratory should establish its own normal and pathological reference ranges for TRAb levels. Also it is recommended that each laboratory include its own panel of control samples in the assay.

10 CLINICAL EVALUATION**10.1 Clinical Specificity**

154 sera from healthy blood donors were assayed in the TRAb ELISA kit.
152 (99%) were identified as being negative for TRAb.

10.2 Clinical Sensitivity

50 sera from patients diagnosed with Graves' Disease were assayed using the TRAb ELISA kit.
49 (98%) were identified as being positive for TRAb.
1 sample (2%) were identified as being within the equivocal range.

10.3 Functional Sensitivity

A plot of inter assay CV against U/L indicates a 20% CV occurring at 0.60 U/L.

10.4 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/L.

10.5 Inter Assay Precision

| Sample | U/L (n=20) | CV (%) |
|--------|------------|--------|
| 1 | 3.9 | 12.9 |
| 2 | 5.4 | 10.9 |

10.6 Intra Assay Precision

| Sample | U/L (n=25) | CV (%) |
|--------|------------|--------|
| 1 | 1.8 | 7.1 |
| 2 | 7.8 | 2.2 |

10.7 Clinical Accuracy

Analysis of sera from patients with autoimmune diseases other than Graves' disease indicated no interference from autoantibodies to thyroglobulin; thyroid peroxidase; glutamic acid decarboxylase; 21-hydroxylase; acetylcholine receptor; dsDNA or from rheumatoid factor.

10.8 Interference

No interference was observed when samples were spiked with the following materials;

| | |
|---------------------------|-------------------------|
| haemoglobin at 5 mg/mL; | bilirubin at 0.2 mg/mL; |
| Intralipid up to 30 mg/mL | |
| human LH up to 10 U/mL; | hCG up to 160 U/mL; |
| human FSH up to 70 U/mL | human TSH up to 30 U/L. |

11 SAFETY CONSIDERATIONS

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signal word: Warning



Hazard statement(s)

H317: May cause an allergic skin reaction

Precautionary statement(s)

P280: Wear protective gloves/protective clothing/ eye protection/face protection

P302 + P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water

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

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

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Follow the instructions carefully.
- Observe expiry dates stated on the labels and the specified shelf life for coated wells, diluted or reconstituted reagents.
- Refer to Safety Data Sheet for more detailed safety information.
- Materials of human origin used in the preparation of the kit have been tested and found non reactive for HIV1 and 2 and HCV antibodies and HBsAg but should none-the-less be handled as potentially infectious.
- Wash hands thoroughly if contamination has occurred and before leaving the laboratory.
- Sterilise all potentially contaminated waste, including test specimens before disposal.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some components contain small quantities of sodium azide as preservative.
- With all kit components, avoid ingestion, inhalation, injection and contact with skin, eyes and clothing.
- Avoid formation of heavy metal azides in the drainage system by flushing any kit component away with copious amounts of water.

12 ASSAY PLAN

| Allow all reagents and samples to reach room temperature (20 °C - 25 °C) before use | |
|--|--|
| Pipette: | 75 µL Start buffer each well (except blank) |
| Pipette: | 75 µL Calibrators (starting with the highest concentration and descending to lowest), controls, patient sera (except blank) |
| Incubate | 2 hours at room temperature on an ELISA plate shaker at 500 shakes/min |
| Aspirate/Decant: | Plate |
| Wash: | Plate once on automatic washer (or wash once, invert and tap dry on absorbent material for manual washing) |
| Pipette: | 100 µL TSH Biotin (reconstituted) into each well |
| Incubate: | 25 minutes at room temperature without shaking |
| Aspirate/Decant: | Plate |
| Wash: | Plate once as above |
| Pipette: | 100 µL SA-POD (diluted 1:20) into each well (except blank) |
| Incubate: | 20 minutes at room temperature without shaking |
| Aspirate/Decant: | Plate |
| Wash: | Plate three times on automatic washer (or wash twice, rinse once with pure water and dry on absorbent material for manual washing) |
| Pipette: | 100 µL TMB into each well (including blank) |
| Incubate: | 30 minutes at room temperature in the dark without shaking |
| Pipette: | 50 µL stop solution into each well (including blank) and shake for 5 seconds |
| Read absorbance at 450 nm, within 15 minutes of adding stop solution | |
| Do not perform the assay at temperatures above 25 °C. | |

1 USO INTESO

Il test ELISA degli autoanticorpi (TRAb) del recettore TSH (TSHR) è inteso per l'uso professionale soltanto per la determinazione quantitative di TRAb in siero umano. L'ipertiroidemia nella malattia di Graves è dovuta alla presenza di autoanticorpi al TSHR e la misura di questi autoanticorpi può essere utile per la diagnosi e il management della malattia.

2 BIBLIOGRAFIA

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

3 PRINCIPIO DEL TEST

Consultare la metodica in inglese.

4 MAGAZZINAGGIO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI DEI SIERI

Il siero dovrebbe essere analizzato presto dopo la separazione in aliquote, magazzinato a -20 °C o a temperature inferiori.

150 µL di campioni sono sufficienti per una analisi.

Ripetuto scongelamento e ricongelamento o temperature di magazzinaggio superiori devono essere evitati.

Magazzinaggio incorretto 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 (20 °C - 25 °C) e mescolare per raggiungere l'omogeneità.

Centrifugare il siero prima del saggio (preferibilmente per 5 minuti a 10-15 000 rpm in una microcentrifuga per rimuovere materiale particolato.

Si prega di non omettere questo passaggio di centrifugazione per sieri che sono opachi o che contengono particolato.

5 MATERIALI RICHIESTI MA NON CONTENUTI NEL KIT

- Pipette per volumi di 50 µL, 75 µL e 100 µL
- acqua pura
- ELISA spettrofotometro per 96 micropozzetti e per misure d'assorbanza a 450 nm.
- agitatore per micro piastre
- pellicola adesiva

6 REAGENTI FORNITI

| | | |
|-----|---------------|--|
| 1. | A | TSH Receptor Coated Wells Micropozzetti ELISA ricoperti con il recettore TSH (totale di 96 pozzetti). Prima di aprire un pacchetto di pozzetti, permettere di raggiungere temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per almeno 30 minuti. Dopo l'apertura, mantenere i pozzetti non utilizzati nel pacchetto originale (chiuso con nastro adesivo) e nella scatola di plastica con l'essicante fornito. Magazzinare a 2 °C - 8 °C e utilizzare alla data di scadenza indicata.. |
| 2. | B | Start Buffer , 10 mL Pronto all'uso |
| 3. | C1 - 4 | Calibrators 1, 2, 8 e 40 U/L (unità NIBSC 08/204) 4 x 1,0 mL, Pronto all'uso. |
| 4. | D1 | Negative Control (controllo negativo), 1,0 mL Pronto all'uso. |
| 5. | D2 | Positive Control (controllo positivo) (Vedi etichetta per il valore aspettato) 1,0 mL Pronto all'uso. |
| 6. | E | TSH Biotin , 3 flaconi liofilizzati; ricostituire il numero richiesto di flaconi di TSH-biotina con 4,5 mL di tampone di ricostituzione ciascuno. Se più di un flacone di TSH-biotina viene utilizzato, unire il contenuto dei flaconi dopo la diluizione e agitare gentilmente prima dell'uso.) Magazzinare a 2 °C - 8 °C alla data di scadenza indicata. |
| 7. | F | Reconstitution Buffer for TSH Biotin (Tampone di ricostituzione per la TSH-biotina), 15 mL Pronto all'uso. |
| 8. | G | Streptavidin Peroxidase (SA-POD) , 0,75 mL Perossidasi di streptavidina, concentrato Diluire 1 a 20 con il diluente di perossidasi p.es. 0.5 mL + 9.5 mL. Magazzinare a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza indicata. |
| 9. | H | Diluent for SA-POD Tampone di diluizione SA-POD, 15 mL Pronto all'uso. |
| 10. | I | Peroxidase Substrate (TMB) , 15 mL Substrato per la perossidasi (benzidine tetrametilico; TMB) Pronto all'uso. |
| 11. | J | Concentrated Wash Solution , 100 mL Tampone di lavaggio concentrato. diluire con 1 litro di acqua pura prima dell'uso. Magazzinare a 2 °C - 8 °C fino alla data di scadenza indicata. |
| 12. | K | Stop Solution (Soluzione d'arresto), 10 mL Pronto all'uso |

7 ATTUAZIONE DEL TEST

Permettere a tutti i reagenti e i campioni di raggiungere temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) per almeno 30 minuti prima dell'uso. Si raccomanda di usare una pipetta Eppendorf a ripetizione per i passaggi 1, 5, 8, 10 & 11. Si raccomanda fortemente la determinazione in doppio per i sieri, i calibratori ed i controlli.

1. Pipettare **75 µL** del tampone di start (B) nei rispettivi pozzetti, lasciando l'ultimo pozzetto per il bianco (vedi passaggio 12).
2. Pipettare **75 µL** dei sieri, dei calibratori (C1-4) e controlli (D1 e D2) nei rispettivi pozzetti (cominciando con lo standard 40 U/L e discendendo fino al controllo negativo e poi ai sieri da analizzare) (eccetto il bianco).
3. Coprire i pozzetti e agitare bene per due ore a temperatura ambiente su un agitatore per micropiastre. (500 rpm)
4. Dopo l'incubazione di due ore, gettare i campioni capovolgendo i pozzetti. Lavare i pozzetti una volta con il tampone di lavaggio, capovolgere i pozzetti e rimuovere eventuali gocce d'acqua premendo la piastra su della carta assorbente.
5. In seguito pipettare esattamente **100 µL** della TSH-biotina ricostituita in ogni pozzetto. È molto importante eseguire questa e le successive operazioni di pipettamento con cautela per evitare la perdita di materiale.
6. Coprire i pozzetti e incubare i pozzetti con la TSH-biotina per 25 minuti a temperatura ambiente senza agitarli.
7. Lavare una volta con il tampone di lavaggio e asciugare la piastra gentilmente con della carta assorbente.
8. Poi pipettare cautamente **100 µL** di SA-POD diluita in ogni pozzetto (eccetto il bianco), coprire la piastra e incubare per 20 minuti a temperatura ambiente senza agitazione.
9. Aspirare il contenuto dei pozzetti usando un lavatore automatico o rimuovendo la miscela con un brusco invertire del sostegno sopra un recipiente appropriato. Lavare i pozzetti due volte con la soluzione di lavaggio diluita (J), seguendo con un lavaggio con acqua pura (per rimuovere ogni schiume) e premere il sostegno invertito gentilmente contro del materiale asciutto assorbente per rimuovere l'eccesso della soluzione di lavaggio (se un lavatore automatico per piastre è usato, le piastre possono essere lavati tre volte con la soluzione di lavaggio diluita (J) soltanto).
10. Pipettare cautamente **100 µL** di substrato della perossidasi (TMB) in ogni pozzetto (incluso il bianco) e incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio.
11. Pipettare **50 µL** della soluzione d'arresto (K) in ogni pozzetto (incluso il bianco), coprire la piastra e agitare per ca. 5 secondi sull'agitatore. Assicurarsi che i tempi d'incubazione dei substrati sono i medesimi per ogni pozzetto.
12. Entro 15 minuti, leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm usando un lettore per piastre ELISA, azzerato contro il pozzetto contenente **100 µL** di TMB (I) e **50 µL** della soluzione d'arresto (K) soltanto.

8 RILEVAMENTO DEI RISULTATI

Una curva di calibrazione può essere costruita riportando la concentrazione dei calibratori sull'asse x (scala logaritmica) contro l'assorbanza dei calibratori sull'asse y (scala lineare).

Le concentrazioni di TRAb nei sieri dei pazienti possono essere letti direttamente dalla curva di calibrazione [a DRG riportato come curva spline log/lin (fattore smoothing = 0)].

Al controllo negativo può essere assegnato un valore di 0,1 per assistere il processo calcolato dei risultati. Altri sistemi di riduzione dei dati possono essere usati.

I risultati possono anche essere espressi come inibizione (%) del legame di TSH calcolato usando la formula:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{Assorbanza del campione a 450 nm}}{\text{Assorbanza del controllo negativo a 450 nm}} \right]$$

Campioni con livelli di TRAb alti possono essere diluiti con il controllo negativo (D1) del kit.

Ad esempio, 20 µL di campioni con 180 µL del controllo negativo per avere una diluizione 10x.

Altri diluizioni (es. 100x) possono essere preparati dalla diluizione 10x o in altri modi appropriati. Alcuni sieri non si comporteranno in maniera lineare e suggeriamo che la diluizione che dà un valore più vicino alla inibizione di 50% viene usata per il calcolo della concentrazione di TRAb.

Esempio di una curva standard

| Sample | A450 (minus blank) | %I | U/L |
|-------------------------|-----------------------|----|-----|
| Negative Control | 2.00 | 0 | 0 |
| C1 | 1.70 | 15 | 1 |
| C2 | 1.50 | 25 | 2 |
| C3 | 0.65 | 68 | 8 |
| C4 | 0.15 | 93 | 40 |
| Positive Control | 1.26 | 37 | 3.5 |

9 VALORI DI CUT-OFF DEL TEST

Comunque, laboratori d'analisi indipendenti dovrebbero stabilire la propria area di riferimento.

| | <u>U/L</u> |
|------------------------|-------------------|
| Negativi | ≤ 1 U/L |
| Marginalmente positivi | $< 1,0 - 1,5$ U/L |
| Positivi | $> 1,5$ U/L |

Questo valore soglia è stato convalidato in DRG. Tuttavia ogni laboratorio dovrebbe stabilire i propri intervalli di riferimento normali e patologici per i livelli di TRAb. Inoltre, si raccomanda che ciascun laboratorio includa il proprio pannello di campioni di controllo nel dosaggio.

10 CLINICAL EVALUATION

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

12 NORME DI SICUREZZA

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Avvertenza: Attenzione



Indicazione di pericolo

H317: Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consiglio di prudenza

P280: Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/Proteggere il viso.

P302 + P352: IF ON SKIN: IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: Lavare abbondantemente con acqua e sapone.

P333 + P313: In caso di irritazione o eruzione della pelle, consultare un medico.

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

- Questo test kit è per il solo uso in vitro, da eseguire da persone professionali.
- Seguire attentamente le istruzioni.
- Osservare le date di scadenze indicate sulle etichette e le stabilità specifiche per i reagenti reconstituiti.
- Guardare la scheda di sicurezza per informazioni di sicurezza più dettagliate.
- Materiali di origine umano usati per la preparazione di questo kit sono stati analizzati e trovati non reattivi per HIV 1 e 2 e anticorpi HCV e HbsAG, ma dovrebbero comunque essere trattati come potenzialmente contagiosi.
- Evitare ingestione, inalazione, iniezione e il contatto con la pelle, gli occhi e gli abiti.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e proteine bovine sono stati ottenuti da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni componenti contengono piccole quantità di azide di sodio come conservante.
- Non inghiottire alcun componente del kit o permettere il contatto con la pelle o le mucose.
- Evitare la formazione di azidi di metalli pesanti nel drainaggio sciacquando i componenti del kit con molta acqua.
- 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 ogni laboratorio include i propri controlli insieme ai controlli provvisti in questo kit.

1 FINALIDAD (USO/UTILIZACIÓN)

El kit de ELISA del autoanticuerpo del receptor de la TSH tiene como finalidad su uso por personal cualificado para la determinación cuantitativa de los autoanticuerpos del receptor de la tirotropina en el suero humano.

El hipertiroidismo en la enfermedad de Graves es debido a la presencia de autoanticuerpos para el receptor de la TSH y la medida de estos autoanticuerpos puede ser útil en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

2 REFERENCIAS

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

3 FUNDAMENTO DEL ENSAYO

En el ensayo TRAb ELISA los autoanticuerpos del receptor de la TSH procedentes del suero de pacientes, de los estándares y de los controles pueden interaccionar con el receptor de la TSH que recubre los pocillos de las placas de ELISA. Después de 2 horas de incubación, las muestras se retiran dejando el TRAb unido al receptor de TSH inmovilizado. Se añade TSH Biotina en un segundo paso de incubación, donde interacciona con los receptores de TSH inmovilizados, que no han sido bloqueados por el TRAb unido procedente del suero de los pacientes, de los estándares y los controles. La cantidad de TSH Biotina unida a la placa se determina en un tercer paso de incubación mediante la adición de avidina unida a peroxidasa, que se une específicamente a la Biotina. El exceso de avidina unida a peroxidasa se lava y la adición del sustrato tetrametilbencidina (TMB) resulta en la formación de un color azul.

Esta reacción se para mediante la adición de la solución de parada que provoca que el contenido de los pocillos vire de azul a amarillo. A continuación se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 450nm utilizando un lector de placas multipocillo. Una absorbancia más baja indica la presencia del TRAb en la muestra ensayada ya que el TRAb inhibe la unión de la biotina-TSH al receptor de TSH que recubre los pocillos de la placa.

El rango del ensayo se encuentra entre 1 – 40 U/L (NIBSC 08/204).

4 ALMACENAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO

El suero a analizar debe ensayarse pronto después de haber sido preparado o almacenado, preferentemente en alícuotas a -20 °C o menor temperatura.

150 µL son suficientes para un ensayo (se recomienda hacer determinaciones duplicadas 75 µL).

Debe evitarse procesos repetidos de congelación/descongelación o aumentos en la temperatura de almacenamiento.

Un almacenamiento incorrecto de las muestras de suero puede llevar a la pérdida de actividad de TRAb.

No usar muestras de suero lipémicas o hemolizadas.

No usar plasma en el ensayo.

Cuando se requiera, descongelar el suero a ensayar a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) y mezclar cuidadosamente para asegurar la homogeneización.

Centrifugue el suero antes del ensayo (preferiblemente durante 5 minutos a 10 000 - 15 000 rpm en una microfuga) para desechar cualquier material particulado. Por favor, no omita este paso de centrifugación para sueros turbios o que contengan material particulado.

5 MATERIALES REQUERIDOS Y NO PROVISTOS

- Pipetas capaces de dispensar 50 µL, 75 µL y 100 µL
- Agua pura
- Lector de placas de ELISA adecuado para placas de 96 pocillos y capaz de realizar medidas a 450nm.
- Agitador de placas de ELISA, capaz de trabajar a 500 agitaciones/min (no un agitador orbital).
- Lámina autoadhesiva

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

| | | |
|-----|---------------|---|
| 1. | A | Coated Wells (Pocillos recubiertos con el receptor de TSH) 12 tiras separables de 8 pocillos (96 en total) en una envoltorio de aluminio y sellada. Todos los reactivos han de estar a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) antes de su uso Asegurar las tiras de los pocillos firmemente en el envoltorio provisto. Después de la apertura retornar los pocillos no utilizados al envoltorio de aluminio original y sellar. Entonces colocar el envoltorio de aluminio en la bolsa de plástico con autosellado junto con el desecante provisto, a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad. |
| 2. | B | Start Buffer (Tampón de Inicio), 10 mL Listo para usar |
| 3. | C1 - 4 | Standards (Estándares) 1, 2, 8 y 40 U/L (las unidades son NIBSC 08/204) 4 x 1.0 mL, Listo para usar. |
| 4. | D1 | Negative Control (Control negativo), 1.0 mL Listo para usar. |
| 5. | D2 | Positive Control (Control positivo) (Ver la etiqueta para el rango) 1.0 mL Listo para usar. |
| 6. | E | TSH Biotin (Biotina TSH), 3 viales Liofilizada Reconstituir cada vial con 4.5 mL del tampón de reconstitución Biotina TSH. Cuando se va a utilizar más de un vial, unir los viales y mezclar cuidadosamente antes de usar. Almacenar a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad. |
| 7. | F | Reconstitution buffer for TSH Biotin (Tampón de reconstitución de la Biotina TSH), 15 mL Listo para usar. |
| 8. | G | Streptavidin Peroxidase (SA-POD) (Estreptavidina peroxidasa), 0.75 mL Concentrada. Diluir 1 en 20 con el diluyente para SA-POD. Por ejemplo, 0.5 mL + 9.5 mL. Almacenar a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad. |
| 9. | H | Diluent for SA-POD (Diluyente para SA-POD), 15 mL Listo para usar. |
| 10. | I | Peroxidase Substrate (Sustrato), 15 mL Listo para usar. |
| 11. | J | Concentrated Wash Solution (Solución de lavado concentrada), 100 mL Concentrado. Diluir a 1 litro con agua pura antes de usar. Almacenar a 2 °C - 8 °C hasta la fecha de caducidad. |
| 12. | K | Stop solution (Solución de parada), 10 mL Listo para usar. |

7 PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

Permita que todos los reactivos y muestras estén a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) durante al menos 30 minutos antes de su uso.

Se sugiere el uso de una pipeta de repetición tipo Eppendorf para los pasos 1, 5, 8, 10 y 11.

Se recomienda encarecidamente realizar mediciones en duplicado para el suero de los pacientes, estándares y controles.

1. Pipetear **75 µL** del tampón de inicio en cada pocillo que va a utilizarse, dejando el último pocillo vacío para un blanco (vea el paso 12).
2. Pipetear **75 µL** del suero de pacientes, estándares (C1-4) y controles (D1, D2) al pocillo respectivo, (comience con las 40 U/L del estándar y descienda en el plato pipeteando el control negativo y el suero de los pacientes), dejando el último pocillo vacío.
3. Cubrir la placa y agitar los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por min.).
4. Después de la incubación, aspirar las muestras mediante el uso de una máquina de lavado de placas o eliminar las muestras mediante la inversión enérgica de la placa o de las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Lavar los pocillos una vez con la solución de lavado, y aspirar el lavado mediante la inversión enérgica de la placa o de las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Golpear suavemente los pocillos invertidos cuidadosamente en una superficie limpia y seca para eliminar el exceso de solución de lavado.
5. Pipetear **100 µL** del reconstituido biotina TSH en cada pocillo (con excepción del blanco). Evitar salpicar el material fuera de los pocillos durante la adición.
6. Cubrir la placa, e incubar a temperatura ambiente durante 25 minutos sin agitar.
7. Repetir el lavado del paso 4.
8. Pipetear **100 µL** de la dilución de SA-POD en cada pocillo (con excepción del blanco) , cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente 20 minutos sin agitar.
9. Después de la incubación, eliminar las muestras por inversión enérgica de la placa o las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Lavar los pocillos dos veces con solución de lavado diluida, seguido de un lavado con agua pura (para remover la espuma) y golpear los pocillos invertidos con cuidado sobre una superficie limpia, seca y absorbente para eliminar el exceso de solución de lavado. (Si se utiliza una máquina de lavado, la placa debe lavarse sólo tres veces con la solución de lavado diluida).
10. Pipetear **100 µL** del sustrato (TMB) en cada pocillo (incluyendo el blanco) e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitar.
11. Pipetear **50 µL** de la solución de parada a cada pocillo (incluyendo el blanco), cubrir la placa y agitar durante aproximadamente 5 segundos en un agitador de placas. Asegurarse de que los tiempos de las incubaciones del sustrato son las mismas para cada pocillo.
12. En 15 minutos, lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA, el blanco se realiza en un pocillo conteniendo solamente **100 µL de sustrato TMB y 50 µL de solución de parada**.

8 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se puede establecer una curva de calibración mediante la representación de la concentración de los estándares en el eje x (escala logarítmica) frente a la absorbancia de los estándares en el eje y (escala lineal). La concentración de TRAb en el suero de los pacientes puede interpolarse a partir de la curva de estándares [representado en DRG como la curva de la función spline log/lin (factor de alisamiento = 0)].

Al control negativo se le puede asignar un valor de 0.1 para ayudar en el procesamiento por computadora de los resultados del ensayo.

También pueden utilizarse otros sistemas de reducción de datos.

Los resultados pueden expresarse también como inhibición (%) de la unión de TSH, calculado según la fórmula:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{Absorbancia a 450 nm de la muestra ensayada}}{\text{Absorbancia a 450 nm del control negativo (D1)}} \right]$$

Muestras con concentraciones elevadas de TRAb pueden diluirse usando el control negativo del kit (D1).

Por ejemplo, 20 µL de la muestra y 180 µL del control negativo para dar una dilución 10x.

Otras diluciones (p.e. 100x) pueden prepararse a partir de una dilución 10x o del modo que se considere apropiado.

Algunos sueros no se diluirán de forma lineal y recomendamos realizar una dilución dando un valor cercano al 50% de inhibición para el cálculo de la concentración de TRAb.

RESULTADOS TÍPICOS

| Muestra | A450 (menos el blanco) | %I | U/L |
|------------------|---------------------------|----|-----|
| Control Negativo | 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 Positivo | 1,26 | 37 | 3,5 |

9 ENSAYO DE CORTE

| Corte | U/L |
|----------|-----------------|
| Negativo | ≤ 1 U/L |
| Equívoco | < 1,0 – 1,5 U/L |
| Positivo | > 1,5 U/L |

Este valor límite ha sido validado en DRG. Sin embargo, cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de referencia normales y patológicos para los niveles de TRAb. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras de control en el ensayo.

10 EVALUACIÓN CLÍNICA**10.1 Especificidad Clínica**

Se ensayaron en el Kit TRAb ELISA, 154 muestras procedentes de donantes de sangre sanos. Se identificaron el 152 (99%) como negativos para autoanticuerpos del receptor de TSH.

10.2 Sensibilidad Clínica

Se ensayaron usando el kit TRAb ELISA, 50 muestras procedentes de pacientes diagnosticados con la enfermedad de Grave.

Se identificaron el 49 (98%) como positivos para autoanticuerpos del receptor de TSH. Se identificaron el 2% dentro del rango equívoco.

10.3 Sensibilidad Funcional

La representación de la CV interensayo contra U/L indica que ocurre un 20% de CV a 0,60 U/L.

10.4 Límite de Detección Inferior

El control negativo del kit se ensayó 32 veces y se calcularon la media y la desviación estándar. El límite de detección inferior a +2 desviaciones estándar fue de 0.21 U/L.

10.5 Precisión Interensayo

| Muestra | U/L (n=20) | CV (%) |
|---------|------------|--------|
| 1 | 3,9 | 12,9 |
| 2 | 5,4 | 10,9 |

10.6 Precisión Intraensayo

| Muestra | U/L (n=25) | CV (%) |
|---------|------------|--------|
| 1 | 1,8 | 7,1 |
| 2 | 7,8 | 2,2 |

10.7 Exactitud Clínica

El análisis del suero de pacientes con enfermedades autoinmunes distintas a la enfermedad de Grave indican que no hay interferencias de autoanticuerpos de tiroglobulina; tiroide peroxidasa; ácido glutámico descarboxilasa; 21-hidroxilasa; receptor de acetilcolina; DNA de doble cadena o factor reumatoide.

10.8 Interferencia

No se observaron interferencias cuando las muestras se mezclaron con las siguientes sustancias;

Hemoglobina a 5 mg/mL;

Bilirrubina a 0,2 mg/nL;

Intralipid hasta 30 mg/mL

LH humana hasta 10 U/mL;

hCG hasta 160 u/mL;

FSH humana hasta 70 U/mL y

TSH humana hasta 30 U/L.

11 CONSIDERACIONES SOBRE LA SEGURIDAD

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Palabra de advertencia: Atención



Indicación de peligro

H317: Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia

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

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

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

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

- Este kit se ha diseñado para uso *in vitro* solamente y para uso por personal profesional.
- Seguir las instrucciones cuidadosamente.
- Observar las fechas de caducidad que aparecen en las etiquetas y la estabilidad específica de los reactivos reconstituídos.
- Para información sobre seguridad mas detallada consultar las hojas de Datos de Seguridad de los Materiales.
- Se han ensayado los materiales procedentes de origen humano usados en este kit y no se han encontrado reactividades para anticuerpos de HIV1 y 2 y HCV y HBsAg pero sin embargo deben ser manejados como potencialmente infecciosos.
- Lavarse las manos a fondo si ocurre contaminación y antes de dejar el laboratorio.
- Esterilizar toda la basura potencialmente contaminada, incluidas las muestras antes de su eliminación.
- Los materiales de origen animal usados en la preparación de este kit se han obtenido de animales certificados como sanos, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos componentes contienen pequeñas cantidades de azida sódica como conservante.
- Evitar ingestión, inhalación, inyección y contacto con la piel, ojos y ropa de todos los componentes del kit.
- Evitar la formación de azidas de metales pesados en el sistema de desagüe, tirar cualquier componente del kit junto con grandes cantidades de agua.

12 PLAN DEL ENSAYO

| | |
|---|---|
| Permitir que todos los reactivos y muestras estén a temperatura ambiente (20 °C - 25 °C) antes de su uso | |
| Pipetear: | 75 µL del tampón de Inicio |
| Pipetear: | 75 µL de los estándares (comenzando con el de mas concentrado y descendiendo al de menor), Controles, Suero de Pacientes |
| Incubar | 2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min |
| Aspirar/Decantar: | Placa |
| Lavar: | Una vez y secar la placa sobre material absorbente |
| Pipetear: | 100 µL de TSH Biotina (reconstituido) a cada pocillo |
| Incubar: | 25 minutos a temperatura ambiente sin agitar |
| Aspirar/Decantar: | Placa |
| Lavar: | Una vez y secar la placa sobre material absorbente |
| Pipetear: | 100 µL SA-POD (diluida 1:20) en cada pocillo (con excepción del blanco) |
| Incubar: | 20 minutos a temperatura ambiente sin agitar |
| Aspirar/Decantar: | Placa |
| Lavar: | Dos veces y aclarar con agua pura y secar sobre papel absorbente |
| Pipetear: | 100 µL de TMB a cada pocillo |
| Incubar: | 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, sin agitar |
| Pipetear: | 50 µL de solución de parada a cada pocillo y agitar durante 5 segundos |
| En 15 minutos, lea la absorbancia a 450 nm | |
| No realizar el ensayo a temperaturas más de 25 °C. | |

1 EINLEITUNG

Der **TSH Receptor Autoantibody ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Thyrotropin-Rezeptor-Autoantikörpern in Humanserum eingesetzt.

Nur für In-vitro Diagnostik.

2 LITERATUR

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

3 TESTPRINZIP

Das Testprinzip entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Anleitung.

4 VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Das gewonnene Serum sollte möglichst schnell bestimmt werden oder in kleinen Portionen bei -20 °C gelagert werden. Pro Bestimmung werden 75 µL Serum benötigt.

Wiederholte Gefrier-/Auftauzyklen oder eine Erhöhung der Lagertemperatur sollten vermieden werden

Eine falsche Lagerung der Serumproben kann zu einem Verlust der TRAb-Aktivität führen.

Lipämische, ikterische und/oder stark hämolytierte Proben sollten nicht verwendet werden.

Keine Plasmaproben in diesem Test verwenden.

Falls erforderlich, sollten Proben vor Testbeginn auf Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) gebracht und vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

Serum vor dem Einsatz im Test zentrifugieren (vorzugsweise 5 Minuten bei 10 000 bis 15 000 rpm in eine Mikrozentrifuge) um Partikel zu entfernen. Diesen Zentrifugationsschritt auf keinen Fall auslassen, für Seren, die sichtbar trüb oder Partikel-haltig sind.

5 NICHT IM KIT ENTHALTENE ABER ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN

- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Aqua dest.
- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät mit 450 ± 10 nm Filter), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (500 U/min), kein Orbital-Schüttler
- Saugfähiges Papier
- Abdeckfolie für die Mikrotiterplatte.

6 KIT-KOMPONENTEN UND DEREN ZUBEREITUNG**1. TSH Receptor Coated Wells**

96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);

Vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (20 °C - 25 °C) stehenlassen

Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

Lagerung bei 2 °C - 8 °C für bis zum Verfallsdatum.

2. Start Buffer, 10 mL

Gebrauchsfertig.

3. Standards

1, 2, 8 und 40 U/L (NIBSC 08/204)

4 x 1,0 mL, Gebrauchsfertig.

4. Negative Control, 1,0 mL

Gebrauchsfertig.

5. Positive Control 1,0 mL

Gebrauchsfertig.

Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett.

6. TSH Biotin, 3 Fläschchen

Lyophilisiert

Jedes Fläschchen mit 4,5 mL TSH Biotin Reconstitution Buffer auflösen. Wird mehr als ein Fläschchen benötigt, den Inhalt der Fläschchen poolen und vorsichtig mischen.

Lagerung: bei 2 °C - 8 °C zum Verfallsdatum des Kits.

7. TSH Biotin Reconstitution Buffer, 15 mL

Gebrauchsfertig.

8. Streptavidin Peroxidase (SA-POD), 1 x 0,75 mL

Konzentrat.

1 + 19 mit SA-POD -Diluent verdünnen, z.B. 0,5 mL + 9,5 mL.

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits.

9. Diluent for SA-POD, 15 mL

Gebrauchsfertig.

10. Peroxidase Substrate (TMB), 15 mL

Gebrauchsfertig.

11. Concentrated Wash Solution, 100 mL

Konzentrat.

Vor Gebrauch mit destilliertem Wasser auf 1000 mL auffüllen.

Lagerung: Bei 2 °C - 8 °C bis zum Verfallsdatum des Kits.

12. Stop Solution, 10 mL

Gebrauchsfertig

7 TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (RT, 20 °C - 25 °C) gebracht und gut durchgemischt werden (mindestens 30 Minuten).

1. Je **75 µL** Start Buffer in die benötigten Vertiefungen pipettieren.
2. Je **75 µL** der Testseren, Kontrollen (und Standards) in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
3. Platte abdecken und für 2 Stunden bei RT auf einem ELISA Plattenschüttler (500 U/min) inkubieren.
4. Nach der 2-stündigen Inkubation, schütten Sie den Inhalt der Platte kräftig über einem Waschbecken aus. Waschen Sie die Vertiefung einmal mit Waschpuffer und klopfen Sie die Platte kopfüber auf saugfähigem Papier aus um noch verbleibende Tropfen des Waschpuffers zu entfernen.
5. Vorsichtig **100 µL** des rekonstituierten TSH-Biotin in jede Vertiefung pipettieren.
Es ist wichtig, ein Herausspritzen der Reagenzien aus den Vertiefungen zu vermeiden.
6. Platte abdecken und 25 Minuten bei RT inkubieren, ohne Schütteln.
7. Waschen wiederholen, wie in Schritt 4.
8. **100 µL verdünnte Streptavidin-Peroxidase (SA-POD)** in jede Vertiefung pipettieren, Platte abdecken und für 20 Minuten bei RT inkubieren, ohne Schütteln.
9. Schütten Sie das SA-POD über einem Becken kräftig aus, waschen Sie zweimal mit Waschpuffer gefolgt von einem Waschschrift mit purem Wasser um verbleibenden Schaum zu entfernen, und klopfen Sie die Vertiefung über Kopf vorsichtig auf saugfähigem Papier aus. Wenn eine Plattenwascheinheit benutzt wird, waschen Sie 3-mal nur mit Waschpuffer (d.h. lassen Sie den Wasser-Waschschrift aus.)
10. **100 µL Peroxidase Substrat (TMB)** in jede Vertiefung pipettieren und für 30 Minuten RT im Dunkeln inkubieren, ohne Schütteln.
11. Stoppen der Substrat-Reaktion durch vorsichtige Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jede Vertiefung. Platte abdecken und für etwa 5 Sekunden auf einem Plattenschüttler schütteln um eine gleichmäßige Durchmischung der Lösung in jeder Vertiefung zu gewährleisten.
Es ist wichtig, dass die Substrat-Inkubationszeit (d.h. die Zeit vom Zeitpunkt der Zugabe des Substrates bis zur Zugabe der Stopplösung) für jedes Well gleich ist.
12. Innerhalb von 15 Minuten die Optische Dichte bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bestimmen. Gemessen wird gegen einen Leerwert (Blank), dafür werden 100 µL Substrate Lösung plus 50 µL Stopplösung in eine Vertiefung pipettiert.

8 ERGEBNISERMITTLUNG

Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.

Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse (lin.) und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse (log.) eingetragen wird.

Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt. Andere Auswertungsfunktionen können verwendet werden.

Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden.

Bei Verwendung einer Auswertesoftware kann der Wert für die Negativkontrolle auf 0,1 gesetzt werden.

Wenn die Ergebnisse als Inhibition der TSH Bindung ausgedrückt werden sollen, wird dieser Index kalkuliert mit folgender Formel:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{OD der Probe bei 450 nm}}{\text{OD der Negativ-Kontrolle bei 450 nm}} \right]$$

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Negative Control* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel einer 1:10 Verdünnung:

20 µL Probe + 180 µL *Negative Control*

Weitere Informationen hierzu entnehmen Sie bitte der englischen Anleitung.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DRG ELISA gezeigt. Diese Werte sollten nicht zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

| Probe | OD 450 (minus Blank) | %I | U/L |
|-------------------------|-------------------------|----|-----|
| Negative Control | 2.00 | 0 | 0 |
| C1 | 1.70 | 15 | 1 |
| C2 | 1.50 | 25 | 2 |
| C3 | 0.65 | 68 | 8 |
| C4 | 0.15 | 93 | 40 |
| Positive Control | 1.26 | 37 | 3.5 |

9 CUT-OFF

| | <u>U/L</u> |
|----------|-----------------|
| Negativ | ≤ 1 U/L |
| Grauzone | < 1,0 – 1,5 U/L |
| Positiv | > 1,5 U/L |

10 KLINISCHE EVALUIERUNG

Die Daten hierzu entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Gebrauchsanweisung.

11 SICHERHEITSHINWEISE

Streptavidin Peroxidase (SA-POD)

Signalwort: Achtung



Gefahrenhinweise

H317: Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

Sicherheitshinweise











P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P302 + P352: BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P333 + P313: Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P362 + P364: Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

SYMBOLS USED

| Symbol | English | Deutsch | Italiano | Español | Français |
|---|---|---------------------------------|---|--|---|
|  | European Conformity | CE-Konformitäts-kennzeichnung | Conformità europea | Conformidad europea | Conformité normes européennes |
|  | Consult instructions for use * | Gebrauchsanweisung beachten * | Consultare le istruzioni per l'uso | Consulte las instrucciones de uso | Consulter les instructions d'utilisation |
|  | <i>In vitro</i> diagnostic medical device * | <i>In-vitro</i> -Diagnostikum * | Dispositivo medico-diagnostico in vitro | Producto sanitario para diagnóstico In vitro | Dispositif médical de diagnostic in vitro |
|  | Catalogue number * | Artikelnummer * | Numero di Catalogo | Número de catálogo | Référence de catalogue |
|  | Batch code * | Chargencode * | Codice del lotto | Código de lote | Numéro de lot |
|  | Contains sufficient for <n> tests * | Ausreichend für <n> Prüfungen * | Contenuto sufficiente per "n" saggi | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenu suffisant pour "n" tests |
|  | Temperature limit * | Temperaturbegrenzung * | Temperatura di conservazione | Temperatura de conservación | Température de conservation |
|  | Use-by date * | Verwendbar bis * | Utilizzare prima del | Establa hasta | Utiliser jusque |
|  | Manufacturer * | Hersteller * | Fabbricante | Fabricante | Fabricant |
|  | Caution * | Achtung * | | | |
| | | | | | |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Solo a scopo di ricerca | Sólo para uso en investigación | Seulement dans le cadre de recherches |
| <i>Distributed by</i> | Distributed by | Vertreiber | Distributore | Distribuidor | Distributeur |
| <i>Content</i> | Content | Inhalt | Contenuto | Contenido | Contenu |
| <i>Volume/No.</i> | Volume / No. | Volumen/Anzahl | Volume/Quantità | Volumen/Número | Volume/Quantité |
| | | | | | |