



**TSH Receptor
Autoantibody-ELISA
3rd generation**

KAPD4834

LOT : 160226/2



TSH Receptor Ab ELISA

en

KAPD4834

IN VITRO DIAGNOSTIC USE

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

1 INTENDED USE

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

B.Rees Smith et al, A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies
Thyroid 2004 14: 830-835

K Kamijo et al, Clinical Evaluation of 3rd Generation assay for Thyrotropin Receptor Antibodies : The M22-biotin-based ELISA initiated by Smith
Endocrine Journal 2005 52: 525-529

A. Theodoraki et al, Performance of a third-generation TSH-receptor antibody in a UK clinic
Clinical Endocrinology 2011 75: 127-133

3 ASSAY PRINCIPLE

In the ELISA kit, TSHR autoantibodies in patient sera, calibrators and controls are allowed to interact with TSH receptors coated onto ELISA plate wells. After a 2 hour incubation, the samples are discarded leaving TRAb bound to the immobilised receptor. A human monoclonal autoantibody to the TSHR labelled with biotin (M22-biotin) is added in a second incubation step, where it interacts with immobilised TSH receptors which have not been blocked by bound TRAb. The amount of M22-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 addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) resulting in the formation of a blue colour. This reaction is stopped by 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 a test sample (as TRAb inhibit the binding of M22-biotin to TSHR coated plate wells).

The measuring range is 0.4 – 30 U/L (NIBSC 90/672).

4 STORAGE AND PREPARATION OF TEST 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 75µL 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 or samples containing particulates.

Do not use plasma in the assay.

When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity. Centrifuge the serum prior to assay (preferably for 5 minutes at 10-15 000 g 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, 100 µl and appropriate volumes for diluting Streptavidin Peroxidase
- Means of diluting concentrated wash solution
- 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 kit and all kit components (1-11) at 2-8°C

- | |
|-----|
| TUJ |
|-----|

 TSH Receptor Coated wells
12 breakapart strips of 8 wells (96 in total) in a frame and sealed in a foil bag. Allow to stand at room temperature for at least 30 minutes before opening.
Ensure strip wells are fitted firmly into frame provided. After opening, return any unused wells to the original foil packet and seal with adhesive tape. Place foil bag in the self-seal plastic bag with desiccant provided, at 2-8°C for up to 15 weeks.
- | | |
|-----|-----|
| INC | BUF |
|-----|-----|

 10 mL
Coloured yellow
Ready for use

3.

CAL	N
-----	---

 N=1 to 5
0.4, 1, 2.5, 10 and 30 U/L (units are NIBSC 90/672)
1.0 mL x 5
Ready for use
4.

CONTROL	L
---------	---

 Negative control
1.0 mL
Ready for use
5.

CONTROL	H
---------	---

 Positive control
(see label for concentration range)
1.0 mL
Ready for use
6.

Ab	BIOT
----	------

 M22-biotin conjugate
15 mL
Coloured red
Ready for use
7.

SAV	HRP	CONC
-----	-----	------

 Streptavidin Peroxidase
1 x 0.75 mL
Concentrated
Dilute 1 in 20 with diluent for Streptavidin Peroxidase
For example, 0.5 mL SAV-HRP + 9.5 mL SAV-HRP diluent
Store at 2-8 °C after dilution for up to kit expiry date
8.

SAV	DIL
-----	-----

 Diluent for Streptavidin Peroxidase
15 mL
Ready for use
9.

CHROM	TMB
-------	-----

 Chromogenic TMB Solution
15 mL
Ready for use
10.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 Concentrated wash solution
100 mL
Concentrated
Dilute to 1 litre with pure water before use
Store at 2-8 °C up to kit expiry
11.

STOP	SOLN
------	------

 Stop solution (0,5 M Sulphuric acid)
10 mL
Ready to use

7 ASSAY PROCEDURE

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

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

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

1. Pipette **75 µL** of incubation buffer into each well to be used, leaving the last well for a blank (see step 12).
2. Pipette **75 µL** of calibrators, controls and test sera into respective wells (start with the 30 U/L standard and descend down the plate to the negative control and then test sera) (except blank).
3. Cover the frame and shake the wells for 2 hours at room temperature (20 – 25 °C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min.).
4. Aspirate well contents by use of a plate washing machine or discard by briskly inverting the frame of stripwells over a suitable receptacle. Wash the wells once by addition of diluted wash solution and aspirating the wash by use of a plate washing machine, or discard the wash by briskly inverting the frame of stripwells 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 M22-biotin 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 streptavidin peroxidase into each well (except blank) and incubate at room temperature for 20 minutes without shaking.
9. Aspirate well contents by use of a plate washing machine or discard by briskly inverting the frame of stripwells over a suitable receptacle. Wash the wells twice with diluted wash solution 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 only).

10. Pipette **100 µL** of TMB into each well (including blank) and incubate in the dark at room temperature for 30 minutes without shaking.
11. Pipette **50 µL** stop solution into each well (including blank), cover the plate and shake for approximately 5 seconds on a plate shaker. Ensure substrate incubation times are the same for each well.
12. Within 5 minutes, read the absorbance of each well at 450nm using an ELISA plate reader, blanked against the well containing **100 µL** of TMB and **50 µL** stop solution 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 patient sera can then be read off the calibration curve [plotted at DIAsource ImmunoAssays S.A. as a spline log/lin curve (smoothing factor = 0)]. Other data reduction systems can be used. The negative control can be assigned a value of 0.04 to assist in computer processing of assay results.

Results can also be expressed as inhibition (%) of M22 binding calculated using the formula;

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{Test sample absorbance at 450 nm}}{\text{Negative control absorbance at 450 nm}} \right]$$

Samples with high TRAb concentrations can be diluted in kit negative control .

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.

9 TYPICAL RESULTS

(Example only, not for use in calculation of actual results)

Sample	Absorbance at 450nm (minus blank)	%Inhibition	U/L
Control L	2.290		
C1	1.987	13	0.4
C2	1.618	29	1
C3	1.108	52	2.5
C4	0.261	89	10
C5	0.079	97	30
Control H	1.488	35	1.3

10 ASSAY CUT OFF

Cut off:	U/L
Negative	< 0.4 U/L
Positive	≥ 0.4 U/L

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.

11 CLINICAL EVALUATION

11.1 Clinical Specificity

139 sera from healthy blood donors were assayed in the 3rd generation TRAb ELISA kit. All 139 were found to be negative for TSHR autoantibodies.

11.2 Clinical Sensitivity

108 sera from patients with Graves' disease (treated and untreated patients) were assayed and 103 (95%) were identified as being positive for TSHR autoantibodies.

11.3 Lower Detection Limit

The kit negative control was assayed 50 times and the mean and standard deviation calculated. The lower detection limit at 2 standard deviations was 0.08 U/L.

11.4 Inter Assay Precision

Sample	U/L (n=25)	CV (%)
1	5.5	8.7
2	1.6	8.8

11.5 Intra Assay Precision

Sample	U/L (n=21)	CV (%)
3	1.3	5.5
4	5.1	4.2

11.6 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.

11.7 Interference

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

Intralipid up to 30 mg/mL;
haemoglobin at 5 mg/mL;
bilirubin up to 0.2 mg/mL;
human LH up to 10 U/mL;
hCG up to 160 U/mL;
human FSH up to 70 U/mL and
human TSH up to 3 mU/mL.

12 SAFETY CONSIDERATIONS

- 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 stability for coated wells and diluted reagents.
- Refer to Materials Safety Data Sheet for more detailed safety information.
- Material of human origin used in the preparation of the kit has 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.

13 ASSAY PLAN

Allow all reagents and samples to reach room temperature (20-25 °C) before use	
Pipette:	75 µL Incubation buffer into each well (except blank)
Pipette:	75 µL calibrators (starting with the highest concentration and descending to the lowest), kit 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 Ab-biotin into each well (except blank)
Incubate:	25 minutes at room temperature without shaking
Aspirate/Decant:	Plate
Wash:	Plate once as above
Pipette:	100 µL SAV-HRP (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 5 minutes of adding stop solution	
Do not perform the assay at temperatures above 25 °C.	

Revision date : 2016-02-26



TSH Receptor Ab ELISA

es

KAPD4834

USO DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

1 INDICACIONES

El kit TSH Receptor (TSHR) Autoantibody (TRAb) ELISA está concebido para ser utilizado por profesionales exclusivamente en la determinación cuantitativa de autoanticuerpos TSHR en suero humano. El hipertiroidismo en la enfermedad de Graves es debido a la presencia de anticuerpos contra los receptores de TSH, pudiendo ser útil la medida de estos anticuerpos en el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

2 BIBLIOGRAFÍA / LITERATURA

B.Rees Smith et al, A new assay for thyrotropin receptor autoantibodies
Thyroid 2004 14: 830-835

K Kamijo et al, Clinical Evaluation of 3rd Generation assay for Thyrotropin Receptor Antibodies: The M22-biotin-based ELISA initiated by Smith
Endocrine Journal 2005 52: 525-529

A. Theodoraki et al, Performance of a third-generation TSH-receptor antibody in a UK clinic
Clinical Endocrinology 2011 75: 127-133

3 PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el kit de ELISA, se deja que los autoanticuerpos TSHR en los sueros de los pacientes, los calibradores y los controles interactúen con los receptores de TSH que recubren los pocillos de las placas de ELISA. Tras una incubación de 2 horas, se desechan las muestras dejando TRAb unidos al receptor inmovilizado. Se añade un anticuerpo monoclonal humano contra los receptores de TSH marcado con biotina (biotina M22) en un segundo paso de incubación, donde interactúa con los receptores de TSH inmovilizados que no han sido bloqueados por los TRAb unidos. A continuación se determina en un tercer paso de incubación la cantidad de biotina M22 unida en la placa mediante la adición de peroxidasa estreptavidina, la cual se une específicamente a la biotina. Luego se lava el exceso de peroxidasa estreptavidina y se añade 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) lo que produce la formación de un color azul. Esta reacción se detiene añadiendo solución de parada que hace que el contenido de los pocillos cambie de azul a amarillo.

A continuación se lee la absorbancia de la mezcla de reacción amarilla a 450 nm utilizando un lector de placas de ELISA.

Una absorbancia inferior indica la presencia de TRAb en una muestra problema (ya que los TRAb inhiben la unión de biotina M22 a los pocillos de la placa recubiertos de TSHR).

El intervalo de medida es de 0,4 a 30 U/l (NIBSC 90/672).

4 CONSERVACIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE SUERO PROBLEMA

Los sueros deberán analizarse poco después de la separación o conservarse, preferiblemente en partes alícuotas, a 20 °C o menos.

150 µl son suficientes para un ensayo (determinaciones por duplicado de 75 µl).

Deben evitarse ciclos repetidos de congelación-descongelación o aumentos en la temperatura de conservación. Una conservación incorrecta de las muestras de suero puede dar lugar a la pérdida de actividad de los TRAb.

No utilice suero lipémico o hemolizado o muestras que contengan partículas.

No utilice plasma en el ensayo.

Cuando sea necesario, descongele los sueros problema a temperatura ambiente y mezcle suavemente para garantizar su homogeneidad.

Centrifugue el suero antes del ensayo (preferiblemente durante 5 minutos a 10-15 000 g en una microcentrifuga) para eliminar las partículas.


No omita este paso de centrifugación para sueros que estén turbios o que contengan partículas.

5 MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Pipetas que puedan dispensar 50 µl, 75 µl, 100 µl y volúmenes adecuados para diluir peroxidasa estreptavidina
- Medios para diluir solución de lavado concentrada
- Agua pura
- Lector de placas de ELISA adecuado para formatos de 96 pocillos y con capacidad para medir a 450 nm
- Agitador de placas, capaz de realizar 500 agitaciones/min (no un agitador orbital)
- Tapa para placas de ELISA

6 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS SUMINISTRADOS

Conserve el kit sin abrir y todos sus componentes (1-11) a 2-8 °C.

-  Pocillos recubiertos de receptor de TSH
12 tiras separables de 8 pocillos (96 en total) en un marco y selladas en una bolsa de aluminio. Deje a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos antes de abrir.

Asegúrese de que las tiras de pocillos estén bien colocadas en el marco proporcionado. Después de abrir, vuelva a guardar los pocillos no utilizados en el paquete de aluminio original y ciérrelo con cinta adhesiva. Coloque la bolsa de aluminio en la bolsa de plástico con autocierre con el desecante proporcionado y conserve a 2-8 °C durante un máximo de 15 semanas.

-  10 ml
De color amarillo
Listo para usar

3.

CAL	N
-----	---

 N = 1 a 5
0,4; 1; 2,5; 10 y 30 U/l (las unidades son del NIBSC 90/672)
1,0 ml x 5
Listo para usar
4.

CONTROL	L
---------	---

 Control negativo
1,0 ml
Listo para usar
5.

CONTROL	H
---------	---

 Control positivo
(véase el intervalo de concentración en la etiqueta)
1,0 ml
Listo para usar
6.

Ab	BIOT
----	------

 Conjugado de biotina M22
15 ml
De color rojo
Listo para usar
7.

SAV	HRP	CONC
-----	-----	------

 Peroxidasa estreptavidina
1 x 0,75 ml
Concentrada
Diluir 1 en 20 con diluyente para peroxidasa estreptavidina
Por ejemplo, 0,5 ml SAV-HRP + 9,5 ml diluyente de SAV-HRP
Conservar a 2-8 °C tras la dilución hasta la fecha de caducidad del kit
8.

SAV	DIL
-----	-----

 Diluyente de peroxidasa estreptavidina
15 ml
Listo para usar
9.

CHROM	TMB
-------	-----

 Solución de TMB cromogénica
15 ml
Lista para usar
10.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 Solución de lavado concentrada
100 ml
Concentrada
Diluir 1 litro con agua pura antes de usar
Conservar a 2-8 °C hasta la caducidad del kit
11.

STOP	SOLN
------	------

 Solución de parada (ácido sulfúrico 0,5 M)
10 ml
Lista para usar

7 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Deje a temperatura ambiente (20-25 °C) todos los reactivos y muestras problema durante 30 minutos como mínimo.

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

Es muy recomendable realizar determinaciones por duplicado de los sueros, calibradores y controles problema.

1. Pipetee **75 µl** de tampón de incubación en cada pocillo que se vaya a utilizar, dejando el último pocillo para el blanco (véase el paso 12).
2. Pipetee **75 µl** de los calibradores, controles y sueros problema en los pocillos respectivos (comience con el estándar de 30 U/l y descienda por la placa hasta el control negativo y después a los sueros problema) (excepto el blanco).
3. Tape el marco y agite los pocillos durante 2 horas a temperatura ambiente (20 – 25 °C) en un agitador de placas de ELISA (500 agitaciones por min.).
4. Aspire el contenido de los pocillos utilizando un lavador de placas o tirelo invirtiendo enérgicamente el marco con las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Lave los pocillos una vez añadiendo solución de lavado diluida y aspirando el lavado utilizando un lavador de placas, o deseche el lavado invirtiendo enérgicamente el marco con las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Golpee suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie limpia, seca y absorbente para retirar el exceso de solución de lavado (solo es necesario si se lava la placa a mano).
5. Pipetee **100 µl** de biotina M22 en cada pocillo (excepto el blanco). No salpique la solución fuera de los pocillos durante la adición.
6. Tape la placa e incube a temperatura ambiente durante 25 minutos sin agitar.
7. Repita el paso 4 de lavado.
8. Pipetee **100 µl** de peroxidasa estreptavidina diluida en cada pocillo (excepto el blanco) e incube a temperatura ambiente durante 20 minutos sin agitar.

9. Aspire el contenido de los pocillos utilizando un lavador de placas o tírelo invirtiendo enérgicamente el marco con las tiras de pocillos sobre un recipiente adecuado. Lave los pocillos dos veces con solución de lavado diluida y a continuación una vez con agua pura (para quitar la espuma que hubiera) y golpee suavemente los pocillos invertidos sobre una superficie limpia, seca y absorbente para retirar el exceso de solución de lavado (si se utiliza un lavador de placas, la placa puede lavarse 3 veces con solución de lavado diluida solamente).
10. Pipetee **100 µl** de TMB en cada pocillo (incluido el blanco) e incube en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos sin agitar.
11. Pipetee **50 µl** de solución de parada en cada pocillo (incluido el blanco), tape la placa y agite durante aproximadamente 5 segundos en un agitador de placas. Asegúrese de que los tiempos de incubación del sustrato son los mismos para cada pocillo.
12. Lea, antes de pasados 5 minutos, la absorbancia de cada pocillo a 450 nm con un lector de placas de ELISA, utilizando como blanco el pocillo que contiene **100 µl** de TMB y **50 µl** de solución de lavado solamente.

8 ANÁLISIS DEL RESULTADO

Se puede establecer una curva de calibración trazando la concentración del calibrador en el eje de abscisas (escala logarítmica) en función de la absorbancia de los calibradores en el eje de ordenadas (escala lineal). A continuación se pueden leer las concentraciones de TRAb en los sueros de los pacientes en la curva de calibración [trazada en DIAsource ImmunoAssays S.A. como una curva spline log/lineal (factor de suavizado = 0)]. Se pueden utilizar otros sistemas de reducción de datos. Al control negativo se le puede asignar un valor de 0,04 para ayudar en el procesamiento informático de los resultados del ensayo.

Los resultados también se pueden expresar como la inhibición (% I) de la unión de M22 calculada empleando la fórmula:

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

Las muestras con concentraciones altas de TRAb se pueden diluir en el control negativo del kit.

Por ejemplo, 20 µl de muestra más 180 µl de control negativo para dar una dilución de 10x.

Pueden prepararse otras diluciones (p. ej., de 100x) a partir de una dilución de 10x, o de otra dilución, según sea adecuado. Algunos sueros no se diluirán de un modo lineal, por lo que sugerimos utilizar la dilución que dé un valor más próximo a la inhibición del 50 % para calcular la concentración de TRAb.

9 RESULTADOS TÍPICOS

(Solo es un ejemplo, no utilizar para el cálculo de resultados reales)

Muestra	Absorbancia a 450 nm (menos blanco)	% Inhibición	U/I
Control L	2.290		
C1	1.987	13	0.4
C2	1.618	29	1
C3	1.108	52	2.5
C4	0.261	89	10
C5	0.079	97	30
Control H	1.488	35	1.3

10 CORTE DEL ENSAYO

Corte:	U/I
Negativo	< 0,4 U/I
Positivo	≥ 0,4 U/I

Cada laboratorio debería establecer sus propios intervalos de referencia normales y patológicos para los niveles de TRAb. También se recomienda que cada laboratorio incluya su propio panel de muestras control en el ensayo.

11 EVALUACIÓN CLÍNICA

11.1 Especificidad clínica

Se analizaron 139 sueros de donantes de sangre sanos en el kit TRAb de ELISA de 3ª generación. Los 139 dieron negativo para autoanticuerpos TSHR.

11.2 Sensibilidad clínica

Se analizaron 108 sueros de pacientes con enfermedad de Graves (pacientes tratados y sin tratar) y 103 (95 %) fueron identificados como positivos para autoanticuerpos TSHR.

11.3 Límite de detección inferior

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

11.4 Precisión interensayo

Muestra	U/I (n = 25)	CV (%)
1	5.5	8.7
2	1.6	8.8

11.5 Precisión intraensayo

Muestra	U/I (n = 21)	CV (%)
3	1.3	5.5
4	5.1	4.2

11.6 Exactitud clínica

El análisis de los sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes distintas a la enfermedad de Graves indicó que no había interferencias de anticuerpos contra la tiroglobulina, la peroxidasa tiroidea, el ácido glutámico descarboxilasa, la 21-hidroxilasa, el receptor acetilcolina, el ADNds ni el factor reumatoide.

11.7 Interferencia

No se observó ninguna interferencia cuando se añadieron a las muestras los siguientes materiales:

Intralípidos hasta 30 mg/ml
Hemoglobina a 5 mg/ml
Bilirrubina hasta 0,2 mg/ml
LH humana hasta 10 U/ml
hCG hasta 160 U/ml
FSH humana hasta 70 U/ml, y
TSH humana hasta 3 mU/ml

12 CONSIDERACIONES DE SEGURIDAD

- Este kit está concebido para uso in vitro por personas profesionales exclusivamente.
- Siga las instrucciones atentamente.
- Observe las fechas de caducidad indicadas en las etiquetas y la estabilidad especificada de los pocillos recubiertos y los reactivos diluidos.
- Consulte en la Ficha de datos de seguridad la información detallada sobre seguridad.
- Se ha analizado el material de origen humano utilizado en la preparación del kit y ha resultado ser no reactivo a anticuerpos del VIH1 y 2, y el VHC ni al HBsAg, aunque no obstante, debería manipularse como potencialmente infeccioso.
- Lávese bien las manos si se ha producido contaminación y antes de salir del laboratorio.
- Esterilice todos los residuos potencialmente contaminados, incluidas las muestras humanas problema antes de su eliminación.
- El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos, pero dicho material debería manipularse como si fuera potencialmente infeccioso.
- Algunos componentes contienen pequeñas cantidades de azida sódica como conservante.
- Evite la ingestión, inhalación, inyección y el contacto con la piel, los ojos y la ropa de todos los componentes del kit.
- Evite la formación de azidas de metales pesados en el sistema de desagüe desechando los componentes del kit por el fregadero con abundante agua.

13 PLAN DEL ENSAYO

Deje que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (20-25 °C) antes de usar	
Pipetear:	75 µl de tampón de incubación en cada pocillo (excepto el blanco)
Pipetear:	75 µl de los calibradores (empezando por la concentración más alta y descendiendo hasta la más baja), los controles del kit y los sueros de los pacientes (excepto el blanco),
Incubar:	2 horas a temperatura ambiente en un agitador de placas de ELISA a 500 agitaciones/min
Aspirar/decantar:	la placa
Lavar:	la placa una vez en un lavador automático (o lavar una vez, invertir y dar golpecitos sobre material absorbente si el lavado es manual)
Pipetear:	100 µl de biotina Ab en cada pocillo (excepto el blanco)
Incubar:	25 minutos a temperatura ambiente sin agitar
Aspirar/decantar:	la placa
Lavar:	la placa una vez como antes
Pipetear:	100 µl de SAV-HRP (diluido 1:20) en cada pocillo (excepto el blanco)
Incubar:	20 minutos a temperatura ambiente sin agitar
Aspirar/decantar:	la placa
Lavar:	la placa tres veces en un lavador automático (o lavar dos veces, aclarar una vez con agua pura y secar sobre material absorbente en caso de lavado manual)
Pipetear:	100 µl de TMB en cada pocillo (incluido el blanco)
Incubar:	30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad sin agitar
Pipetear:	50 µl de solución de parada en cada pocillo (incluido el blanco) y agitar durante 5 segundos
Leer la absorbancia a 450 nm antes de 5 minutos desde que se añadió la solución de parada	
No realizar el ensayo a una temperatura superior a 25 °C.	

Fecha de revisión: 26-01-2015