


Anti-R-TSH

REF RLTRE 96.3




Détermination quantitative des anticorps anti-récepteur à la thyrotrophine dans le sérum humain

DEFINITION

Le **coffret Anti R-TSH** () est réservé à l'usage des professionnels pour la détermination quantitative des autoanticorps anti-récepteurs de la thyrotrophine dans le sérum humain. L'hyperthyroïdisme de la maladie de Basedow est causée par la présence d'auto-anticorps anti-récepteurs de la TSH et la détermination de ces anticorps peut être précieuse pour le diagnostic différentiel ainsi que pour le suivi de la maladie de Basedow.

PRINCIPE DU TEST

Le **coffret Anti R-TSH** () constitue une méthode de détection immunoenzymatique par compétition. Les autoanticorps anti R-TSH présents vont se fixer sur les récepteurs immobilisés sur la phase solide de la microplaque.

Après une période d'incubation de 2 heures, les sérums sont éliminés par retournement. Seuls les anticorps anti R-TSH, s'ils existent, restent fixés sur les récepteurs à la TSH de la phase solide.

Un anticorps monoclonal humain anti-récepteur de la TSH marqué à la biotine M22 est ajouté lors de la deuxième incubation, et interagit avec les récepteurs TSH libres c'est à dire non occupés par les autoanticorps provenant des calibrateurs, contrôles ou sérums de patients.

La quantité de biotine-M22 fixée sur la plaque est ensuite déterminée au cours d'une troisième incubation par l'ajout de streptavidine-peroxydase qui se fixe spécifiquement à la biotine.

L'excès de conjugué de streptavidine-peroxydase est éliminé par l'étape de lavage suivante. L'ajout du substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) fait apparaître une coloration bleue proportionnelle à la quantité de TSH-biotine fixées.

Cette réaction est arrêtée par l'ajout d'une solution d'arrêt qui fait virer le contenu du puits de bleu à jaune.

L'absorbance de la réaction jaune est lue à 450nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. Une faible absorbance indique la présence d'anticorps anti R-TSH dans l'échantillon car ils empêchent la fixation de la biotine-M22 aux plaques recouvertes de récepteurs TSH.

MATÉRIEL NECESSAIRE MAIS NON FOURNI

- ♦ Pipettes de précision 50µl, 75µl, 100µl et flacon adapté pour diluer le réactif SAPOD (F)
- ♦ Consommables pour effectuer la dilution de la solution de lavage concentrée
- ♦ Eau distillée
- ♦ Lecteur de plaques ELISA muni de filtres de 450nm.
- ♦ Agitateur de plaques ELISA, 500 rpm (agitation non orbitale)

CONSERVATION ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- Les sérums doivent être analysés juste après centrifugation ou conservés de préférence en aliquots à -20°C ou en-dessous.
- 150µL suffisent à la réalisation d'un test (Il est conseillé d'effectuer des dépôts en double (2x75µl)).
- Les congélations/décongélations répétées ou l'augmentation de la température de stockage doivent être évitées.
- Un stockage inadéquat des échantillons peut entraîner une perte d'activité des anticorps anti R-TSH.
- Ne pas utiliser d'échantillons hémolysés ou lipémiques ou des sérums contenant des particules.
- Ne pas utiliser de plasma pour ce test. Si nécessaire, ramener le sérum à température ambiante et mélanger pour en assurer l'homogénéité.
- Centrifuger les sérums avant de réaliser le test (de préférence durant 5 minutes à 10-15 000g dans un microtube) pour enlever toutes particules. Ne pas oublier cette étape de centrifugation pour les sérums troubles ou contenant des particules.

PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Lire attentivement les instructions avant toute manipulation.

- A Microplaques recouvertes de R-TSH**
12 barrettes amovibles et sécables de 8 micropuits (96 en tout) sur un support et emballées dans un sachet d'aluminium.
Laisser les barrettes revenir à température ambiante au moins 20 minutes avant l'ouverture du sachet. MP
- Fixer correctement le nombre de barrettes de puits nécessaire au test sur le support fourni. Après ouverture, remettre tous les puits inutilisés dans le sachet d'aluminium d'origine et refermer avec du ruban adhésif. Remplacer le sachet d'aluminium dans le sac plastique refermable avec le sachet déshydratant fourni et conserver entre +2°C et +8°C pendant 3 mois.*
- B Tampon d'incubation**
10 ml - Solution de couleur jaune BUF START
Prêt à l'emploi
- C1-5 Calibrateurs**
0,4 ; 1 ; 2,5 ; 10 et 30 u/L (unités NIBSC 90/672)
5 x 1 ml CAL C?
Prêt à l'emploi
- D1 Contrôle Négatif**
1 ml CONTROL -
Prêt à l'emploi
- D2 Contrôle Positif** (intervalles des concentrations : voir étiquette)
1 ml CONTROL +
Prêt à l'emploi

- E Biotine-M22**
15 ml – Solution de couleur rouge BIOTIN M22
Prêt à l'emploi
- F Streptavidine-Peroxydase (SA POD)**
1 x 0,75 ml SA POD
Concentrée
*Diluer au 1:20 à l'aide du diluant pour SA POD (G).
Par exemple, 0,5 ml de (F) + 9,5 ml de (G).
A conserver entre +2°C et +8°C après dilution jusqu'à
la date de péremption du coffret.*
- G Diluant pour SAPOD**
15 ml DIL SA POD
Prêt à l'emploi
- H Substrat Peroxydase (TMB)**
15 ml SUBS TMB
Prêt à l'emploi
- I Solution de lavage concentrée**
100 ml BUF WASH 10x
Concentrée
*Diluer 10 fois avec de l'eau distillée avant utilisation
pour obtenir 1 litre.
A Conserver entre +2°C et +8°C jusqu'à la date de
péremption du coffret.*
- J Solution d'arrêt**
10 ml SOLN STOP
Prêt à l'emploi

Les coffrets non utilisés ainsi que leurs composants (A à J) doivent être conservés entre +2°C et +8°C.

MODE OPÉRATOIRE

Ramener tous les réactifs à température ambiante (entre +20°C et +25°C) au moins 30 minutes avant la manipulation. Il est recommandé d'utiliser une pipette à répétition pour les étapes 1, 5, 8, 10 et 11.

- Déposer **75µl de tampon d'incubation (B)** dans chaque puits à utiliser (réserver un puits vide pour faire le blanc) (puis se référer au paragraphe 12).
- Déposer **75µl de calibrateurs (C1-C5)**, de **contrôles (D1 et D2)** et de **sérums dilués** dans leurs puits respectifs (commencer avec 30u/L de calibrateur et continuer en déposant les contrôles et les sérums à tester).
- Couvrir le support et agiter les puits pendant 2 heures à température ambiante (+20°C/+25°C) à l'aide d'un agitateur de plaques ELISA (500 rpm.).
- Aspirer les puits à l'aide d'un laveur de plaques ou les vider en retournant le support des micropuits au-dessus d'un réceptacle adéquat. Laver les puits une fois avec **350µl de Solution de lavage diluée (I)** et aspirer la solution en utilisant un laveur de plaque ou vider les puits en retournant le support des micropuits au-dessus d'un réceptacle adéquat. Taper ensuite les puits retournés sur une surface absorbante pour retirer l'excès de solution de lavage (uniquement pour les lavages manuels).
- Déposer **100µl de biotine-M22 (E)** dans chaque puits (sauf dans le puits blanc). Éviter de déposer du liquide hors des puits lors de l'ajout.

- Couvrir la plaque, et incuber à température ambiante pendant 25 minutes sans agiter.
- Répéter l'étape de lavage décrite au point 4.
- Déposer **100µl de Streptavidine-peroxydase diluée (F)** dans chaque puits (sauf dans le puits blanc) et incuber à température ambiante pendant 20 minutes sans agiter.
- Après l'incubation, aspirer le contenu des puits à l'aide d'un laveur de plaques ou les vider en retournant le support des micropuits au-dessus d'un réceptacle adéquat. Laver les puits deux fois avec **350µl de Solution de lavage diluée (I)** et une fois avec de l'eau distillée (pour retirer toute mousse) et taper les puits retournés sur une surface absorbante pour retirer l'excès de solution de lavage. (si le laveur de plaque est utilisé, la plaque peut être lavée 3 fois avec la **Solution de lavage diluée (I)**).
- Déposer **100µl de Substrat TMB (H)** dans chaque puits (ainsi que dans le puits réservé au blanc) et incuber à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes sans agiter.
- Déposer **50µl de Solution d'arrêt (J)** dans chaque puits (ainsi que dans le puits réservé au blanc) et agiter la plaque pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaque. Assurez-vous que les temps d'incubation du substrat sont identiques pour chaque puits.
- Lire l'absorbance de chaque puits à 450nm en utilisant un lecteur de plaque ELISA, et faire le blanc sur le puits contenant seulement **100µl de substrat TMB (H)** et **50µl de solution d'arrêt (J)**.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Une courbe de calibration peut être établie en traçant la concentration du calibrateur sur l'axe horizontal (échelle log) et l'absorbance des calibrateurs sur l'axe vertical (échelle linéaire).

Les concentrations en anticorps anti-récepteurs de la TSH des sérums peuvent être lues sur la courbe d'étalonnage.

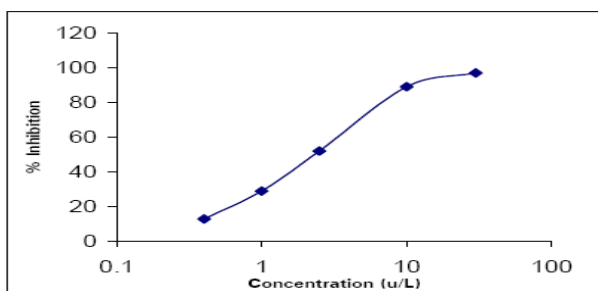
D'autres systèmes de réduction de données peuvent être utilisés. Les résultats peuvent aussi être exprimés comme l'inhibition (%I) de la fixation du M22, ceci est alors calculé grâce à la formule suivante :

$$100 \times \left\{ 1 - \frac{\text{absorbance de l'échantillon à 450 nm}}{\text{absorbance du contrôle négatif (D1) à 450 nm}} \right\}$$

RESULTATS ATTENDUS

(l'exemple ci-dessous ne doit pas être utilisé pour le calcul des résultats)

Échantillon	Absorbance à 450 nm (sans le blanc)	%I	u/L
Contrôle D1	2,290	0	0
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
Contrôle D2	1,488	35	1,3



SEUIL DE DÉTECTION DU DOSAGE

Seuil de détection	u/L
Négatif	< 0.4 u/L
Positif	≥ 0.4 u/L

ÉVALUATION CLINIQUE

Spécificité Clinique

139 échantillons de donneurs sains ont été testés à l'aide du coffret **Anti R-TSH** ($\frac{bmd}{\text{mcm}}$). Les 139 échantillons se sont révélés négatifs pour les autoanticorps anti R-TSH.

Sensibilité Clinique

108 échantillons de patients diagnostiqués avec la maladie de Basedow (traités et non traités) ont été testés à l'aide du coffret **Anti R-TSH** ($\frac{bmd}{\text{mcm}}$). 103 échantillons (soit 95%) ont été retrouvés positifs pour les autoanticorps anti-R-TSH.

Seuil de détection

Le contrôle négatif a été testé 50 fois, la moyenne et l'écart type ont été calculés. La seuil de détection à +2 écart-type était de 0,08 u/L.

Reproductibilité

Echantillon	u/L (n = 25)	CV (%)
1	5,5	8,7
2	1,6	8,8

Répétabilité

Echantillon	u/L (n = 21)	CV (%)
1	1,3	5,5
2	5,1	4,2

Précision Clinique

L'analyse des sérums de patients atteints de maladies autoimmunes autres que la maladie de Basedow n'indique pas d'interférence avec les auto-anticorps à la thyroglobuline; à la peroxydase de thyroïde; acide glutamique decarboxylase; 21-hydroxylase; récepteur d'acétylcholine; dsDNA ou facteur rhumatoïde.

Interférence

Aucune interférence n'a été observée lorsque les échantillons ont été étudiés en solution avec les éléments suivants : hémoglobine jusqu'à 5mg/ml ; bilirubine jusqu'à 0,2mg/ml ; LH humaine jusqu'à 10u/ml ; hCG jusqu'à 160u/ml ; FSH humaine jusqu'à 70u/ml et la TSH humaine jusqu'à 3 u/L.

Les valeurs mentionnées ci-dessus ne sont fournies qu'à titre indicatif. Il est recommandé que chaque laboratoire inclue son propre panel d'échantillons de contrôle dans le dosage en même temps que les contrôles fournis dans le coffret.

Chaque laboratoire doit établir ses propres valeurs de référence sur des sérums normaux et pathologiques pour les niveaux d'anticorps anti-récepteurs de la TSH.

AVERTISSEMENTS ET PRÉCAUTIONS

- Ce coffret est réservé au diagnostic *in vitro* et à un usage professionnel.
- Suivre attentivement les instructions et respecter les dates de péremptions indiquées sur les étiquettes. Se référer à la Fiche de Données Sécurité pour plus d'informations.
- Les produits d'origine humaine utilisés dans la préparation de ce coffret ont été testés et se sont révélés négatifs pour les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2 et les anticorps HCV et HBsAg mais devraient être manipulés comme potentiellement infectieux.
- Se laver les mains complètement si la contamination avait eu lieu et avant de quitter le laboratoire.
- Stériliser tout déchet potentiellement contaminé, y compris les échantillons de test avant leur élimination.
- Les produits d'origine animale utilisés dans la préparation du coffret ont été obtenus d'animaux sains mais doivent cependant être manipulés comme potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités d'azide de sodium (<0.1% w/v) comme agent de conservation.
- Éviter l'ingestion, l'inhalation, l'injection et le contact avec la peau, les yeux et les vêtements.
- Éviter la formation de blocs d'azides dans les systèmes d'évacuation en rinçant abondamment avec de l'eau.

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test ELISA



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence Catalogue



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer

RÉFÉRENCES

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

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

1. Ramener tous les réactifs et échantillons à température ambiante (+20°C/+25°C) avant utilisation.
2. Déposer **75µl** de tampon d'incubation dans chaque puits (excepté dans le puits réservé au blanc)
3. Déposer **75µl** de Calibrateurs (en commençant avec la concentration la plus élevée puis diminuer les concentrations jusqu'à la plus basse), puis **75µl** de Contrôles et Sérums (excepté dans le puits réservé au blanc)
4. Incuber 2 heures à température ambiante sur un agitateur de plaque ELISA à 500 rpm
5. Aspirer les micropuits de la plaque avec un laveur de plaque ou vider les en retournant le support de micropuits au-dessus d'un réceptacle adéquat
6. Laver les puits une fois avec **350µl de Solution de lavage diluée**.
Pour les lavages automatisés : Aspirer la solution en utilisant un laveur de plaque
Pour les lavages manuels : Retourner la microplaque au-dessus d'un papier absorbant et taper pour retirer l'excès de solution de lavage.
7. Déposer **100µl** de biotine-M22 dans chaque puits (excepté le puits blanc)
8. Incuber 25 minutes à température ambiante **sans agiter**
9. Aspirer la plaque
10. Laver les puits une fois avec **350µl de Solution de lavage diluée**.
Pour les lavages automatisés : Aspirer la solution en utilisant un laveur de plaque
Pour les lavages manuels : Retourner la microplaque au-dessus d'un papier absorbant et taper pour retirer l'excès de solution de lavage.
11. Déposer **100µl** de SAPOD (dilué au 1:20) dans chaque puits (excepté le puits blanc)
12. Incuber 20 minutes à température ambiante **sans agiter**
13. Aspirer la plaque ou vider les puits par retournement
14. Pour les lavages automatisés : Laver la plaque 3 fois avec **350µl de Solution de lavage diluée**.
Pour les lavages manuels : Laver la plaque 2 fois avec **350µl de Solution de lavage diluée** puis rincer avec de l'eau distillée et sécher à l'aide d'un papier absorbant
15. Déposer **100µl** de TMB dans chaque puits (ainsi que dans le puits réservé au blanc)
16. Incuber 30 minutes à température ambiante **dans l'obscurité**
17. Déposer **50µl** de solution d'arrêt dans chaque puits (ainsi que dans le puits réservé au blanc) et agiter pendant 5 secondes.
18. Lire l'absorbance à 450 nm

Ne pas réaliser le test à une température supérieure à +25°C

BioMédical Diagnostics SA



Siège social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12

Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com

Internet : www.bmd-net.com


Anti R-TSH

Quantitative determination of thyrotropin receptor autoantibodies in human serum

REF **RLTRE 96.3**



INTENDED USE

The **Anti R-TSH kit** () is intended for use by professional persons only for the quantitative determination of thyrotropin receptor autoantibodies in human serum. Hyperthyroidism in Graves' disease is due to the presence of autoantibodies to the TSH receptor and measurement of these autoantibodies can be useful in disease diagnosis and management.

ASSAY PRINCIPLE

In the ELISA, TSH receptor 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 TSH receptor labelled with biotin (M22-biotin) is added in a 2nd 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 TSH receptor coated plate wells).

MATERIALS REQUIRED AND NOT SUPPLIED

- ◆ Pipettes capable of dispensing 50µL, 75µL, 100µL and appropriate volumes for diluting SAPOD (F).
- ◆ Means of diluting concentrated wash (I).
- ◆ Pure water.
- ◆ ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring at 450nm.
- ◆ ELISA Plate shaker, capable of 500 shakes/min (not an orbital shaker).

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.
- 150µL is sufficient for one assay (duplicate 75µL determinations are recommended).
- 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 000g in a microfuge) to remove any particulate matter. Please do not omit this centrifugation step for sera that are cloudy or contain particulates.

PREPARATION OF REAGENTS SUPPLIED

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 for at least 20 minutes before opening.

MP

Ensure stripwells 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, store between +2°C and +8°C for up to 12 weeks.

B Start Buffer

10 mL – Coloured yellow

Ready to use

BUF **START**

C1-5 Calibrators

0.4, 1, 2.5, 10 and 30 u/L (units are NIBSC 90/672)

5 x 1.0 mL

Ready to use

CAL **C?**

D1 Negative control

1.0 mL

Ready to use

CONTROL **-**

- D2 Positive control**
(See label for concentration range)
1.0 mL
Ready to use
- E M22-Biotin**
15 mL – Coloured red
Ready to use
- F Streptavidin-Peroxidase (SAPOD)**
1 x 0.75 mL
Concentrated
Dilute 1 in 20 with diluent for SAPOD (G). For example, 0.5mL (F) + 9.5 mL (G).
Store at +2°C/+8°C after dilution for up to kit expiry date.
- G Diluent for SAPOD**
15 mL
Ready to use
- H Peroxidase Substrate (TMB)**
15 mL
Ready to use
- I Concentrated wash solution**
100 mL
Concentrated
Dilute to 1 litre with pure water before use. Store at +2°C/+8°C up to kit expiry.
- J Stop solution**
10 mL
Ready to use

CONTROL	+
---------	---

BIOTIN	M22
--------	-----

SA POD

DIL	SA POD
-----	--------

SUBS	TMB
------	-----

BUF	WASH	10x
-----	------	-----

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

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

ASSAY PROCEDURE

Allow all reagents and test samples to stand at room temperature (between +20°C and +25°C) for at least 30 minutes. A repeating pipette is recommended for steps 1, 5, 8, 10 & 11.

- Pipette **75µL** of **start buffer** (B) into each well to be used, leaving one well empty for blank (step 12).
- Pipette **75µL** of **calibrators** (C1-5), **controls** (D1 and D2) and **test sera** into respective wells (start with the 30u/L calibrator and descend down the plate to the negative control and then test sera) (except blank).
- Cover the frame and shake the wells for 2 hours at room temperature (+20°C/+25°C) on an ELISA plate shaker (500 shakes per min.).
- 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 with **350µL of diluted Wash Solution** (I), 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).
- Pipette **100µL of M22-Biotin** (E) into each well (except blank). Avoid splashing the material out of the wells during addition.
- Cover the plate, and incubate at room temperature for 25 minutes without shaking.
- Repeat wash step 4.

- Pipette **100µL of diluted Streptavidin-peroxidase** (F) into each well (except blank) and incubate at room temperature for 20 minutes without shaking.
- After incubation, discard the well contents by briskly inverting the frame of stripwells over a suitable receptacle. Wash the wells twice with **350µL of diluted Wash Solution** (I) 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 (I) only).
- Pipette **100µL of TMB Substrate** (H) into each well (including blank) and incubate in the dark at room temperature for 30 minutes without shaking.
- Pipette **50µL Stop solution** (J) into each well (including blank) and shake the plate for approximately 5 seconds on a plate shaker. Ensure substrate incubation times are the same for each well.
- Read the absorbance of each well at 450nm using an ELISA plate reader, blanked against the well containing **100µL of TMB substrate** (H) and **50µL Stop solution** (J) only.

RESULTS 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.

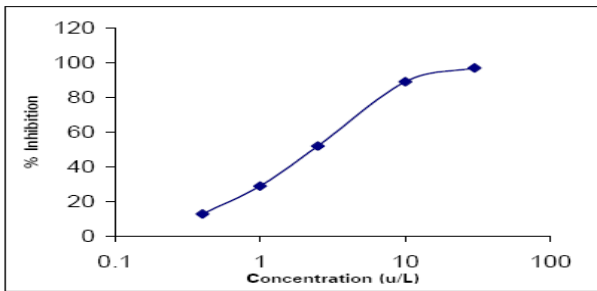
Other data reduction systems can be used. Results can also be expressed as inhibition (%I) of M22 binding calculated using the formula;

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

TYPICAL RESULTS

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

Sample	Absorbance at 450nm (minus blank)	%I	u/L
Control D1	2.290	0	0
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 D2	1.488	35	1.3



ASSAY CUT OFF

Cut off	u/L
Negative	< 0.4 u/L
Positive	≥ 0.4 u/L

CLINICAL EVALUATION

Clinical Specificity

139 samples from healthy blood donors were assayed in the 3rd generation **Anti R-TSH kit** ([bmd](#)). All 139 were found to be negative for TSH receptor autoantibodies.

Clinical Sensitivity

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

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.

Inter Assay Precision

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

Intra Assay Precision

Sample	u/L (n = 21)	CV (%)
1	1.3	5.5
2	5.1	4.2

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 rheumatoid factor.

Interference

No interference was observed when samples were spiked with the following materials; intralipid up to 30mg/mL; haemoglobin up to 5 mg/mL; bilirubin up to 0.2 mg/mL; human LH up to 10u/mL; hCG up to 160u/mL; human FSH up to 70u/mL and human TSH up to 3 u/L.

The data quoted in these instructions should be used for guidance only. 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.

SAFETY CONSIDERATION

- 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 reconstituted reagents. Refer to Materials Safety Data Sheet for more detailed safety information.
- Material 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.

SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity
	ELISA Test
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device
	Catalogue number
	Lot Number
	Expiry Date
	Number of test
	Consult Instructions
	Temperature limitation
	Biological risk
	Contains sodium azide
	Reconstitute

REFERENCES

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

ASSAY SCHEME

1. Allow all reagents and samples to reach room temperature (+20°C/+25°C) before use
2. Pipette: **75µL** Start buffer into each well (except blank)
3. Pipette: **75µL** Calibrators (starting with the highest concentration and descending to lowest), kit Controls, Patient Sera (except blank)
4. Incubate 2 hours at room temperature on an ELISA **plate shaker at 500 shakes/min**
5. Aspirate/Decant: Plate
6. Wash: Plate once **with 350 µL of diluted wash solution**
For automatic washing: Aspirate well contents by use of a plate washing machine
For manual washing: Invert and tap dry on absorbent material for manual washing.
7. Pipette: **100µL** M22-biotin into each well (except blank)
8. Incubate: 25 minutes at room temperature **without shaking**
9. Aspirate/Decant: Plate
10. Wash: Plate once **with 350 µL of diluted wash solution**
For automatic washing: Aspirate well contents by use of a plate washing machine
For manual washing: Invert and tap dry on absorbent material for manual washing.
11. Pipette: **100µL** SAPOD (diluted 1:20) into each well (except blank)
12. Incubate: 20 minutes at room temperature **without shaking**
13. Aspirate/Decant: Plate
14. For automatic washing: Wash Plate three times on automatic washer **with 350 µL of diluted wash solution.**
For manual washing: Wash twice **with 350 µL of diluted wash solution**, rinse once with pure water and dry on absorbent material
15. Pipette **100µL** TMB into each well (including blank)
16. Incubate 30 minutes at room temperature **in the dark without shaking**
17. Pipette **50µL** Stop Solution into each well (including blank) and shake for 5 seconds
18. Read absorbance at 450 nm

Do not perform the assay at temperatures above +25°C

BioMédical Diagnostics SA



Office

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com