

TSH kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung des Thyreoidea-Stimulierenden Hormons (TSH) in humanem Blutserum

(Gebrauchsanweisung: Seite 3)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of thyroid-stimulating hormone in human serum

(Instructions for use: page 26)

Manueller Test / Manual test

Abschnitt / Section 13

Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 14



TSH Kit (Manueller Test)
TSH kit (manual test)



96 Untersuchungen
96 tests

24-01



TSH Kit (Automatisierter
Test für "Alisei")
TSH kit (automated test for
"Alisei")















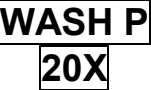










96 Untersuchungen
96 tests

24-01 A



1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **TSH Testkit** wird für die **quantitative Bestimmung** des **Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH)** in **humanem Blutserum** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 24-01** Für den manuellen Gebrauch;
- REF 24-01 A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;
- Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkit:*

- REF 24-01 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";
- REF 24-01** nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

Das TSH ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von cirka 30 000 Da, das aus zwei Untereinheiten, Alpha und Beta, besteht. TSH wird im Hypophysenvorderlappen gebildet und stimuliert in der Schilddrüse die Synthese von Triiodthyronin und Thyroxin. Die Bestimmung von TSH hat diagnostische Bedeutung bei der Beurteilung des Schilddrüsenstatus.

3. TESTPRINZIP

Der **TSH Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope der TSH- β -Untereinheit binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden. Die TSH-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-TSH-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1).

Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur TSH-Konzentration in der Probe.

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbtintensität ist direkt proportional zur TSH-Konzentration der Probe. Die TSH-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

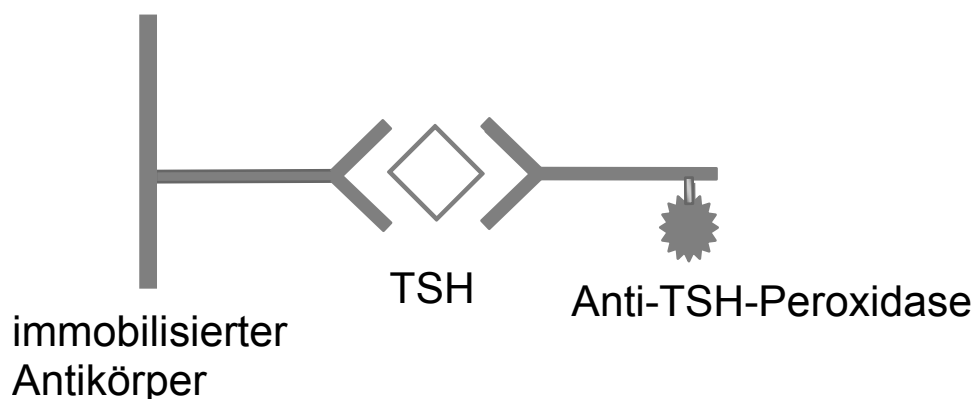


Abb. 1 Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **TSH Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Verfallsdatum zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 12 Monate. Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig), Probenverdünnungspuffer: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen des Trial- und Waschlösung-Konzentrates und der Stopplösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: im dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25°C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage;
- Geöffnete Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämischer (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **TSH Testkits** wurden Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr bei 140 gesunden 21-45 jährigen Männern und Frauen entnommen wurden, untersucht.

Die ermittelten TSH-Konzentrationen liegen zwischen 0,23 - 3,4 $\mu\text{IU/ml}$ (Mittelwert: 1,37 $\mu\text{IU/ml}$). Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die TSH-Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern. Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig.

Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten: Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.

Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt. 0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert. Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Zubereitung der benötigten Menge der **Waschlösung** durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

Sollte die erwartete TSH-Konzentration der Proben höher als im Kalibrator 5 sein, werden die Proben (sowohl beim manuellen Gebrauch als auch beim automatisierten Test, entsprechend der jeweiligen Gebrauchsanweisung) 20fach mit Probenverdünnungspuffer **DIL** wie folgt verdünnt:

380 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 20 µl Probe
Vortexen und gründlich mischen.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **TSH Testkit** wurde gemäß dem zweiten internationalen Referenzpräparat WHO 80/558 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Laut der Produktspezifikation des Lieferanten liegt die Kreuzreaktion der beiden verwendeten monoklonalen Antikörper mit hCG, LH sowie FSH unter 1,0%.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **TSH Testkits**, die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,05 µIU/ml (manueller and Alisei Test).

Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der Optischen Dichte des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+ 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **TSH Kit** ist validiert für die Detektion eines TSH-Konzentrationsbereiches (ohne Verdünnung) von 0,05 – 15 $\mu\text{IU/ml}$ (beim manuellen Test) und 0,05 - 50 $\mu\text{IU/ml}$ (für den automatisierten Test für „Alisei“).

10.5 Hook Effekt:

Für den **TSH Testkit** konnte der High-Dose-Hook-Effekt bis zu Konzentrationen von 800 $\mu\text{IU/ml}$ nicht beobachtet werden. Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken der Kalibrator 0 mit Antigen bestimmt.

10.6 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 12fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manueller Testkit

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, $\mu\text{IU/ml}$	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	0,70	0,036	4,9
2	1,0	0,05	4,6
3	1,3	0,049	3,9
4	1,7	0,01	2,8
5	2,4	0,06	2,5
6	4,3	0,11	2,4
7	6,8	0,17	2,5
8	10,5	0,13	1,2

Alisei Testkit

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, $\mu\text{IU/ml}$	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	0,54	0,022	4,0
2	1,6	0,11	6,8

3	3,2	0,17	5,1
4	4,0	0,12	3,1
5	5,4	0,27	5,0
6	6,8	0,14	2,1
7	7,9	0,17	2,2
8	10,1	0,33	3,3

Um einen **inter-assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 8 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manueller Testkit

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, $\mu\text{IU/ml}$			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	0,39	0,38	0,36	0,015	4,1
2	0,52	0,55	0,53	0,015	2,9
3	0,99	0,94	0,98	0,026	2,7
4	1,18	1,18	1,19	0,006	0,5
5	1,66	1,59	1,74	0,075	4,5
6	2,28	2,22	2,25	0,030	1,3
7	3,07	3,04	3,25	0,114	3,6
8	4,65	4,79	4,73	0,070	1,5

Alisei kit

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, $\mu\text{IU/ml}$			Inter-assay VK	
	2. Test	3. Test	4. Test	SD	VK, %
1	0,54	0,62	0,57	0,040	7,0
2	1,6	1,4	1,5	0,100	6,7
3	3,2	3,5	3,7	0,252	7,3
4	4,0	4,1	4,5	0,265	6,3
5	5,4	6,0	5,5	0,321	5,7
6	6,8	6,3	6,6	0,252	3,8
7	7,9	8,5	7,7	0,416	5,2
8	10,1	9,3	9,2	0,493	5,2

11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

Der **TSH Testkit** wird hauptsächlich für die Diagnostik von Schilddrüsenunterfunktionen angewendet. Die messbare Konzentration vom TSH beträgt maximal 15 $\mu\text{IU/ml}$ beim manuellen Gebrauch und 50 $\mu\text{IU/ml}$ bei automatisierten Test für „Alisei“.



Für eine Differenzialdiagnostik von Euthyreose und Schilddrüsenüberfunktion wird empfohlen, Proben mit geringer TSH-Konzentration mit dem **TSH 3rd generation Testkit** der Astra Biotech GmbH (**REF 24-02**) erneut zu untersuchen, (Messbereich der TSH-Konzentrationen: 0,01–2,5 $\mu\text{IU/ml}$).

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.

- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 M Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
 - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
 - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;

- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, jedes Mal die TSH-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden. Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen,
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- 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;
- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501- Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 24-01)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen TSH-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-TSH-Antikörpern konjugiert mit HRP	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	TSH Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierten TSH-Konzentrationen: 0; 0,25; 0,75; 2,5; 7,5; 15 µIU/ml. Die exakten TSH-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	TSH Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter TSH-Konzentration. Der TSH-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 280 ml Lösung.	14 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
DIL	Probenverdünnungspuffer: Proteinpuffer	3,0 ml gebrauchsfertig

13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **TSH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank= OD der TMB-Lösung).

13.3.1 Testdurchführung

(Testschema, Abschnitt 13.5)

Alle Proben sollten in Doppelbestimmung getestet werden.

- A. 100 µl Konjugat CONJ in alle Kavitäten pipettieren, Kavitäten **A1, A2** bleiben frei («Blank»);**
- B. 50 µl Kalibratoren CAL; Kontrolle CONTROL und Serumproben in Zweifachbestimmung in die jeweiligen Kavitäten pipettieren (**außer Kavität A1 und A2**);**
- C. 60 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren;**
- D. 5x, wie unten beschrieben, waschen;**
- E. 100 µl Substrat SUB in jede Kavität (auch Blank) pipettieren, die Streifen entweder bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im Dunkeln innerhalb von 15–30 Minuten je nach der Intensität des Färbung oder für 10 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.**
- F. 100 µl Stopplösung STOP in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat hinzufügen und für 1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln.**
- G. Messen der Optischen Dichte bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten.**

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD_{450 nm})

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,500$ (nach Blank Subtraktion);

- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Flaschenetikett angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren bei 450 nm werden gegen deren jeweilige TSH-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Konzentration des TSH in der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für TSH-Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten, ist nicht zulässig. In diesem Fall müssen die Proben 20x mit dem Probenverdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Die gemessene Konzentration der verdünnten Probe muss mit dem Verdünnungsfaktor (20x) multipliziert werden.

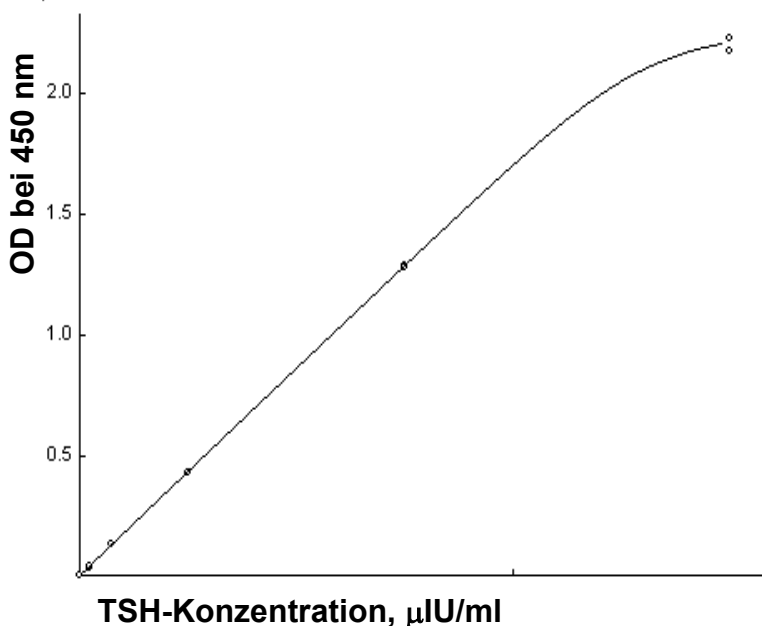


Abb. 2 Typische Standardkurve
Beispielstandardkurve!
Nicht zur Auswertung benutzen!

13.5 Testschema

Kavitäten Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
CONJ	–	100 µl	100 µl
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
Inkubation No.1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No.2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (24-01A).

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen TSH-Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-TSH-Antikörpern konjugiert mit HRP	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	TSH Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierten TSH-Konzentrationen: 0; 0,25; 0,75; 2,5; 15, 50 µIU/ml. Die exakten TSH-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	8 Fläschchen je 0,5 ml, CAL 1,4-2 × 0,5ml CAL 0,2,3,5 - 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	TSH Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Konzentration. Der TSH-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen
DIL	Probenverdünnungspuffer: Proteinpuffer	3,0 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert *;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **TSH Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzien Vorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der **Trial-Lösung** vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder entionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL 5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der TSH-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4. Datenverarbeitung

14.4.1. Datenverarbeitung (OD_{450 nm})

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um den möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **TSH kit** is provided for the **quantitative** determination of thyroid-stimulating hormone (TSH) in human serum.

This test has 2 complete sets:

REF 24-01 for manual use;

REF 24-01 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for analyser

Note 1: *Take into account that calibrators’ nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of the test*

REF 24-01 A *only on analyser “Alisei”,*

REF 24-01 *only for manual use.*

When using a non-predefined method of use, it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

TSH is a glycoprotein with a molecular mass of about 30 000 Da, that consists of two subunits – alpha and beta. TSH is secreted by frontal lobe of pituitary gland and stimulates thyroxin and triiodothyronine synthesis in thyroid gland. TSH assay is important in evaluation for thyroid status.

3. PRINCIPLE OF TEST

The TSH kit is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of TSH β -subunit. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. TSH molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-TSH-peroxidase conjugate (Fig. 1).

Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to TSH level in sample.

During incubation with substrate the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to the concentration of TSH in specimens or calibrators. TSH concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

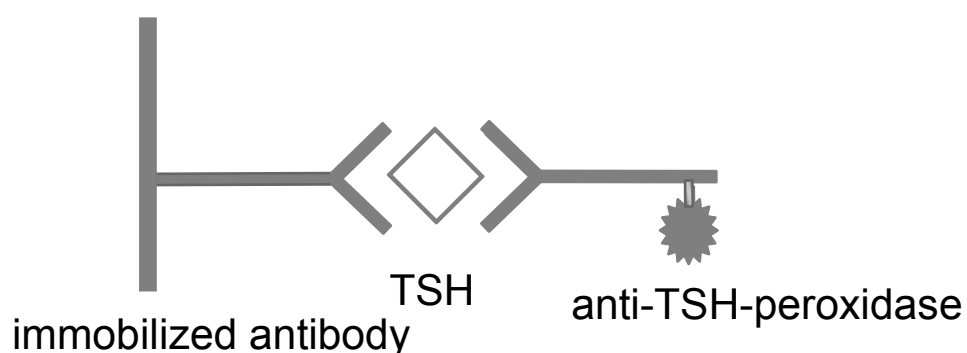


Fig. 1 Assay scheme

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

The **TSH kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at 25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 12 months.

After initial opening, the kit is stable until expiration date if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators, control (ready-to-use), sample diluent: at +2...+8 °C until the expiration date; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store specimens at +2...+8 °C for no more than 2 days; for longer storage it is recommended to aliquot and freeze them at ≤ -20 °C. Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 140 apparently healthy people (both males and females) between the ages of 21–45, were assayed with **TSH kit**. TSH concentration range was 0.23–3.4 $\mu\text{IU/mL}$ (mean: 1.37 $\mu\text{IU/mL}$). These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of TSH concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir

MP Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL CONTROL Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example: 5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

If expected TSH concentration in the samples is higher than in **calibrator 5**, the samples should be diluted 20-fold with sample diluent **DIL** in concordance with instructions for use for manually or analyser “Alisei” before analysis.

The example of manual sample dilution as follows:

380 μ L sample diluent **DIL** + 20 μ L serum sample

Vortex or mix thoroughly.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1 Calibration – Traceability:

The **TSH kit** was calibrated against the WHO 2nd International Reference Preparation 80/558.

10.2 Specificity:

According to Product specification, provided by the supplier, cross-reactivity of both monoclonal antibodies with hCG; LH and FSH does not exceed 1.0%.

10.3 Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **TSH kit** i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 0.05 μ IU/mL (manual test and Alisei kit).

It is defined as mean OD of 10 replicates of Calibrator 0 plus two standard deviations.

10.4 Measurement Range:

The **TSH kit** was validated for measurement of TSH concentration within the concentration diapason (without dilution) of 0.05 - 15 $\mu\text{IU/mL}$ (for manual test) and 0.05 - 50 $\mu\text{IU/mL}$ (for analyser "Alisei").

10.5 Hook Effect:

For **TSH kit** high dose hook effect was not detected for concentrations up to 800 $\mu\text{IU/mL}$. High dose hook effect was determined by spiking Calibrator 0 with antigen.

10.6 Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For **intra-assay CV** determination, 8 serum samples were run, each in 12 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	0.70	0.036	4.9
2	1.0	0.05	4.6
3	1.3	0.049	3.9
4	1.7	0.01	2.8
5	2.4	0.06	2.5
6	4.3	0.11	2.4
7	6.8	0.17	2.5
8	10.5	0.13	1.2

Alisei kit

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	0.54	0.022	4.0

2	1.6	0.11	6.8
3	3.2	0.17	5.1
4	4.0	0.12	3.1
5	5.4	0.27	5.0
6	6.8	0.14	2.1
7	7.9	0.17	2.2
8	10.1	0.33	3.3

For **inter-assay CV** determination 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 8 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	0.39	0.38	0.36	0.015	4.1
2	0.52	0.55	0.53	0.015	2.9
3	0.99	0.94	0.98	0.026	2.7
4	1.18	1.18	1.19	0.006	0.5
5	1.66	1.59	1.74	0.075	4.5
6	2.28	2.22	2.25	0.030	1.3
7	3.07	3.04	3.25	0.114	3.6
8	4.65	4.79	4.73	0.070	1.5

Alisei kit

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	0.54	0.62	0.57	0.040	7.0
2	1.6	1.4	1.5	0.100	6.7
3	3.2	3.5	3.7	0.252	7.3
4	4.0	4.1	4.5	0.265	6.3
5	5.4	6.0	5.5	0.321	5.7
6	6.8	6.3	6.6	0.252	3.8
7	7.9	8.5	7.7	0.416	5.2
8	10.1	9.3	9.2	0.493	5.2

11. LIMITATION OF THE METHOD


Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic method alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.

The **TSH assay** is intended mainly for diagnostics of hypothyroidism. The highest measurable TSH concentration without dilution is about 15 $\mu\text{IU/mL}$ (for manual test) or 50 $\mu\text{IU/mL}$ (for analyser “Alisei”).




For the differential diagnosis of euthyroidism and hyperthyroidism it is highly recommended to re-test the samples with low TSH concentrations with **TSH 3rd generation assay** (calibration range 0.01–2.5 $\mu\text{IU/mL}$) available from Astra Biotech, **REF 24-02**.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.

- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 M HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time TSH concentration in the control.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents.

Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.

-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.
-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **DIL**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;

- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye 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;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 24-01)

13.1 Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-TSH monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-TSH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	TSH calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known TSH concentrations - 0; 0.25; 0.75; 2.5; 7.5; 15 μ U/mL. For exact TSH concentrations see vial labels	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	TSH control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known TSH concentration. For exact range of TSH concentration see vial label	0.5 mL, ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 280 mL of solution	14 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent: protein-based solution	3.0 mL, ready to use

13.2 Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator/shaker (+37 °C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3 Test Procedure

The **TSH kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1 Assay Procedure

(Assay scheme, section 13.5)

All samples should be tested in duplicates.

- A.** Pipette **100 µL conjugate [CONJ]** into each well, **except wells A1-A2 (blank);**
- B.** Pipette **50 µL of calibrators [CAL], control [CONTROL] and patient's samples in duplicates,** into the respective wells; **except wells A1-A2.**
- C.** Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm).**
- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **100 µL substrate [SUB]** into each well (including blank); incubate strips **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** depending on the colour intensity or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- F.** Pipette **100 µL stop solution [STOP]** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**
- G.** Read **OD at 450 nm within 20 min.**

13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 μ L of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times; strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4 Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1 Data Reliability (OD_{450 nm})

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.5 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the vial label.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators are plotted at 450 nm versus their respective TSH concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of TSH in samples using standard curve.

Extrapolation of the standard curve to TSH concentration above the nominal value of calibrator 5 is not permitted. In this case the sample should be diluted 20-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by dilution factor (20-fold).

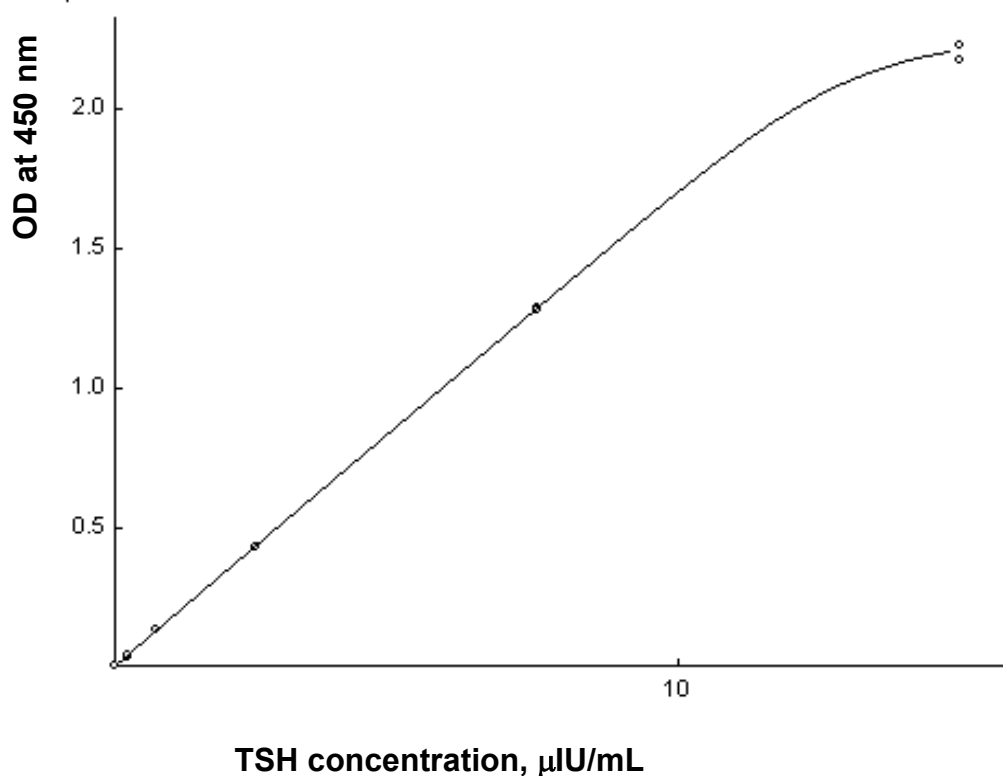


Fig. 2.
Example of
typical standard
curve
Do not use
for evaluation
of real assay
data!

13.5 Assay scheme

Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
Reagents			
CONJ	–	100 µL	100 µL
CAL CONTROL	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

AUTOMATIC TEST (REF 24-01 A)**14.1 Material Provided**

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-TSH monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution contains anti-TSH monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	TSH calibrators: protein-based solution or lyophilized preparations containing known TSH concentrations - 0; 0.25; 0.75; 2.5; 15; 50 μ U/mL. For exact TSH concentrations see vial labels	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1, 4 – 2 \times 0.5 mL; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 \times 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	TSH control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known TSH concentration. For exact range of TSH concentration see vial label	2 \times 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order
DIL	Sample diluent: protein-based solution	3.0 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser "Alisei".

14.2 Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated¹;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3 Test Procedure

The **TSH kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1 Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature, and then thoroughly stir.

Note: *Preparation of other reagents see in section 8.*

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

¹ Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

14.3.2 Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation TSH concentration is hardwired in analyser memory.

14.4 Data Processing

14.4.1 Data Reliability (OD_{450 nm})

See criteria in section **13.4.1**.

14.5 Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

March, 01, 2018



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de