

TSH 3rd generation kit

3.Generation ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung des Thyreoidea-stimulierenden Hormons in humanem Blutserum

(Gebrauchsanweisung: Seite 3)

Third generation enzyme immunoassay for quantitative determination of thyroid stimulating hormone in human serum

(Instruction for use: page 20)

IVD









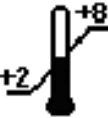













24-02

REF



96 Untersuchungen
96 tests

1. KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGENDS

	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
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
			
	Kalibratoren Calibrators		Kontrolle Control
	Optische Dichte Optical density		
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **TSH 3rd generation Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung niedriger Konzentrationen des Thyreoidea-stimulierenden Hormons (TSH) in humanem Serum** bestimmt.

TSH ist ein Glykoprotein mit einer Molekularmasse von circa 30 000 Da, das aus den zwei Untereinheiten, Alpha und Beta, besteht. TSH wird im Hypophysenvorderlappen gebildet und stimuliert in der Schilddrüse die Synthese von Triiodthyronin und Thyroxin. Die TSH-Untersuchung dient der Bewertung des Schilddrüsen-Status. Die Bestimmung von TSH mittels **TSH 3rd generation Testkit** wird für die Differentialdiagnose von Euthyreose und Hyperthyreose eingesetzt.

3. TESTPRINZIP

Der **TSH 3rd generation Kit** 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 Farbintensität 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.

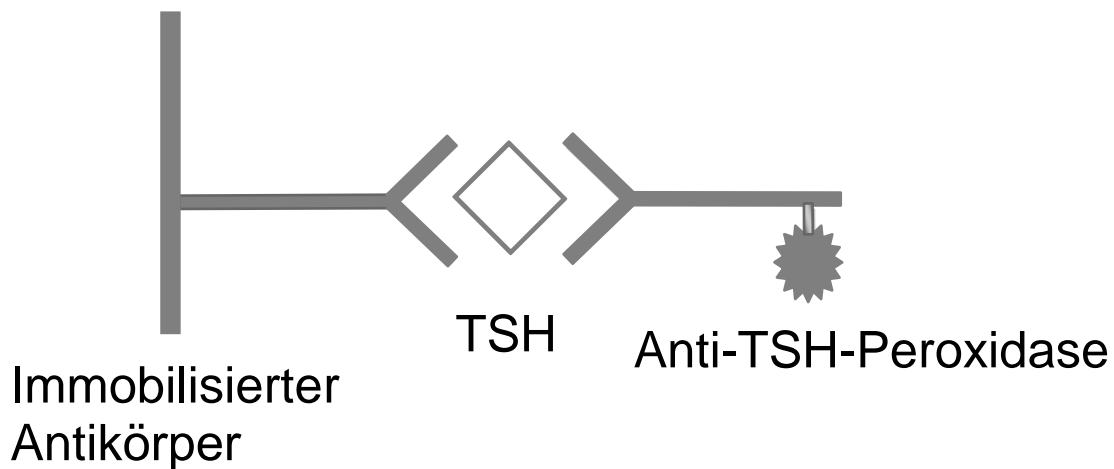


Abb.1 Testschema

4. PACKUNGSINHALT

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-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 definierter TSH-Konzentration: 0; 0,02; 0,075; 0,25; 0,75; 2,5 μ U/ml. Die exakten TSH-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen, 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

SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 280 ml Lösung.	14 ml, konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	14 ml, gebrauchsfertig

5. ERFORDERLICHE, ABER NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND EQUIPMENT

- kalibrierte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- kalibrierte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 400-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Vortexer;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Messzylinder, Becherglas;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit der 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

6. 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 3rd generation kit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Ablauf der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 12 Monate. Nach der Öffnung 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): 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 mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen des Waschpuffer-Konzentrates und der Stopplösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen.

.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.

7. 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 Blutserumproben 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.

8. TESTABLAUF

Der **TSH 3rd generation kit** 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).

8.1 Reagenzienvorbereitung

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 den 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 lyophilisierten Kalibratoren und die 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.

8.2 Probenvorbereitung

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

8.3 Testdurchführung

(siehe Testschema Abschnitt 15)

- A. 50 µl Kalibratoren CAL; Kontrolle CONTROL und Patientenprobe in Zweifachbestimmung** in die jeweiligen Kavitäten pipettieren; Kavitäten, **A1, A2 bleiben frei** («Blank»).
- B. 100 µl Konjugat CONJ** in jede Kavität **außer Kavität A1, A2** pipettieren.
- 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 **bei Raumtemperatur 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, für **1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln**.
- G. Messen der Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Wasch-Volumen 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 8.1) 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.

9. 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 = $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

9.1 Datenverlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrator 5 $\geq 1,5$ (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.

9.2 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 (etwa 2,5 $\mu\text{IU/ml}$), ist nicht zulässig.

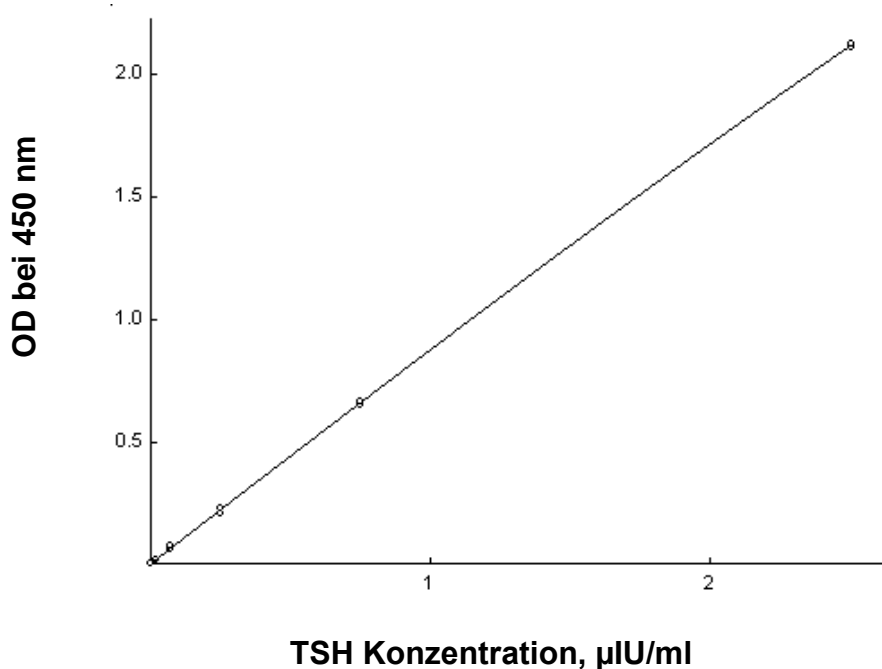


Abb. 2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

10. REFERENZWERTE

Der mit Hilfe des **TSH 3rd generation Kits** ermittelte TSH-Konzentrationsbereich von Blutserumproben, welche bei 140 gesunden 21-45 jährigen Männer und Frauen entnommen wurden, liegt zwischen 0,23 -3,4 $\mu\text{IU/ml}$.

Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe. Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die TSH-Normkonzentrationen bestimmt.

11. 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.

12. TESTCHARAKTERISTIKA

12.1 Eichung:

Der **TSH 3rd generation Kit** wurde gegen das zweite internationale Referenzpräparat der WHO 80/558 kalibriert.

12.2 Spezifität:

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

12.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **TSH 3rd generation Kits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,01 $\mu\text{IU/ml}$.

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

12.4 Messbereich:

Der **TSH 3rd generation Kit** wurde zur Detektion eines TSH-Konzentrationsbereiches (ohne Verdünnung) von 0,01-2,5 μ U/ml validiert.

12.5 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, μ U/ml	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	0,02	0,004	20,9
2	0,13	0,020	15,0
3	0,2	0,022	11,2
4	0,5	0,041	8,3
5	1,2	0,067	5,6
6	1,8	0,058	3,2
7	2,2	0,023	1,0
8	2,3	0,019	0,8

Um einen **inter-assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Probe	Mittlere TSH-Konzentration, $\mu\text{IU/ml}$			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	0,21	0,20	0,25	0,026	12,0
2	0,42	0,38	0,42	0,023	5,7
3	1,04	1,12	1,08	0,040	3,7
4	1,32	1,26	1,30	0,031	2,4
5	1,24	1,28	1,30	0,031	2,4
6	1,68	1,65	1,58	0,051	3,1
7	2,05	2,00	2,14	0,071	3,4
8	2,10	2,12	2,16	0,031	1,4

13. 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 3rd generation Kit** wird hauptsächlich für die Differenzialdiagnose von Euthyreose und Hypereuthyreose angewendet.



Ist die Konzentration von TSH in der Probe höher als des Kalibrators 5, sollte die Probe mit dem **TSH Kit** (REF 24-01) der Astra Biotech GmbH erneut untersucht werden, da dieser für ein Konzentrationsbereich von 0,25- 15 $\mu\text{IU/ml}$ validiert ist.

14. 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 Packungsinhalt 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 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 sollten bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, 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:
 - Während der Durchführung 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**, **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.

15. TESTSCHEMA

Kavität	«Blank»	CAL	Proben
Reagenzien		CONTROL	
CAL	–	50 µl	–
CONTROL			
Proben	–	–	50 µl
CONJ	–	100 µl	100 µl
Inkubation №1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µL		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №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		

2. INTENDED USE

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

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.

Determination of TSH level by third generation kit is used for the differential diagnosis of euthyroidism and hyperthyroidism.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **TSH (third generation) 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 the sample.

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

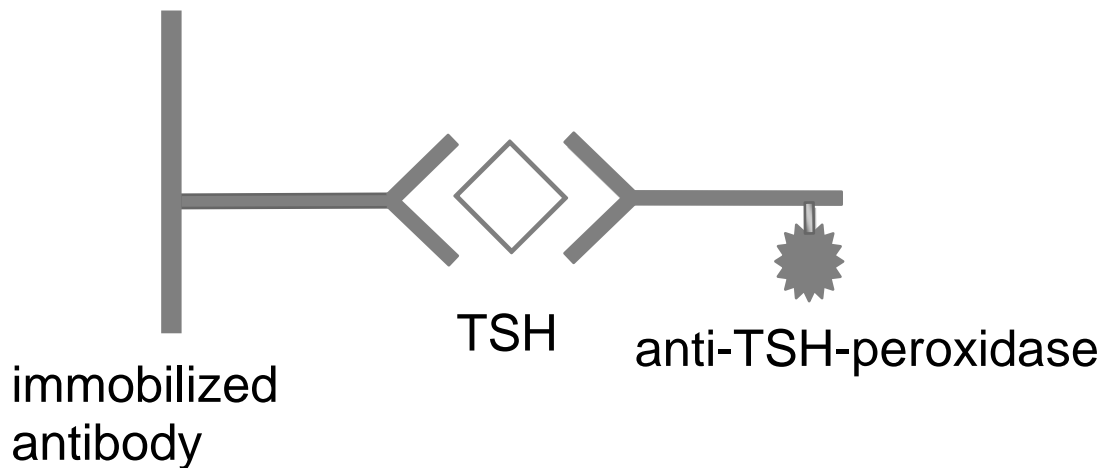


Fig. 1 Assay scheme

4. MATERIALS 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; 0.02; 0.075; 0.25; 0.75; 2.5 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
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use

WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 280 mL of solution	14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	14 mL, ready to use

5. 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, shaking speed 400–800 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).

6. 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 (third generation) 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 the 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 and control (ready-to-use): 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;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with 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 maximal 4 weeks in a firmly closed bottle.

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.

7. 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 serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

8. TEST PROCEDURE

The **TSH (third generation) 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.

8.1. 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 into strip holder. Place unused strips onto 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.

8.2. Sample Preparation

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

8.3. Assay Procedure

(See assay scheme section 15)

- A.** Pipette **50 μ L** of **calibrators** **CAL** (0-5), **control** **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **100 μ L** of **conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**
- C.** Incubate strips for **60 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**
- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **100 μ L substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature 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 μ L 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.**

Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 μ L 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 µL of wash solution (section 8.1) 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.

9. 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 = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

9.1. Data Reliability (for OD measured at 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.

9.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD values of the calibrators 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.

Any extrapolation of the standard curve to TSH concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 2.5 $\mu\text{IU/mL}$) is forbidden.

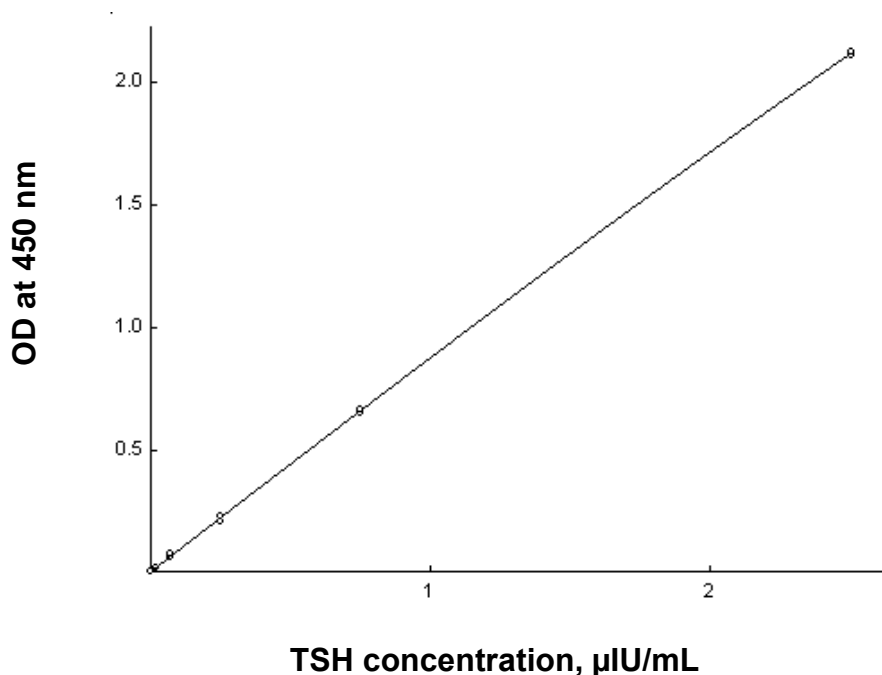


Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

10. EXPECTED VALUES

Level of TSH in serum samples collected from 140 apparently healthy people at the age 21–45 was 0.23–3.4 $\mu\text{IU/mL}$.

These limits should be considered as guidelines only.

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

11. 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.

12. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

12.1. Calibration – Traceability:

The **TSH (third generation)** kit is calibrated against the WHO 2nd International Reference Preparation 80/558.

12.2 Specificity:

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

12.3 Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **TSH (third generation) assay**, or the lowest detectable concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 0.01 $\mu\text{IU/mL}$. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

12.4. Measurement Range:

The **TSH (third generation) kit** was validated for measurement of TSH concentration within the concentration diapason (without dilution) of 0.01-2.5 $\mu\text{IU/mL}$.

12.5. Intra- and Inter-Assay Variation:

For **intra-assay CV** determination 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	0.02	0.004	20.9
2	0.13	0.020	15.0
3	0.2	0.022	11.2
4	0.5	0.041	8.3
5	1.2	0.067	5.6
6	1.8	0.058	3.2
7	2.2	0.023	1.0
8	2.3	0.019	0.8

For **inter-assay CV** determination 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval.

Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Sample	Mean TSH concentration, $\mu\text{IU/mL}$			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	0.21	0.20	0.25	0.026	12.0
2	0.42	0.38	0.42	0.023	5.7
3	1.04	1.12	1.08	0.040	3.7
4	1.32	1.26	1.30	0.031	2.4
5	1.24	1.28	1.30	0.031	2.4
6	1.68	1.65	1.58	0.051	3.1
7	2.05	2.00	2.14	0.071	3.4
8	2.10	2.12	2.16	0.031	1.4

13. LIMITATION OF THE METHOD




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


This **TSH (third generation) kit** is specially intended for differential diagnostics of euthyrosis and hyperthyrosis.


If TSH concentration in the sample is higher than in calibrator 5, the sample should be assayed with **TSH kit** (REF 24-01) from Astra Biotech with detectable concentration range of 0.25-15 $\mu\text{IU/mL}$.

14. 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**, **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.

15. ASSAY SCHEME

Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
Reagents			
CAL CONTROL	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
CONJ	–	100 µL	100 µL
Incubation №1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation №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		

January, 26, 2016



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