

# Product information

Information about other products is available at: [www.demeditec.com](http://www.demeditec.com)



User's Manual

# TSH ELISA



DE4171



96

**Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu**

1	INTRODUCTION .....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST .....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
10	LIMITATIONS OF USE.....	9
11	LEGAL ASPECTS .....	9
12	REFERENCES / LITERATURE.....	10
1	EINLEITUNG.....	11
2	TESTPRINZIP .....	11
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	11
4	BESTANDTEILE DES KITS .....	12
5	PROBENVORBEREITUNG.....	13
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	14
7	ERWARTETE WERTE .....	15
8	QUALITÄTS-KONTROLLE.....	15
9	ASSAY CHARACTERISTIKA.....	16
10	GRENZEN DES TESTS .....	16
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	17
12	REFERENZEN / LITERATUR .....	17
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS.....	18

## INTRODUCTION

### 1.1 Intended Use

The **DEMEDITEC TSH ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of TSH in serum.

### NOT INTENDED FOR NEWBORN SCREENING.

### 1.2 Summary and Explanation

Measurement of the serum concentration of thyrotropin (TSH), a glycoprotein with a molecular weight of 28,000 daltons and secreted from the anterior pituitary, is generally regarded as the most sensitive indicator available for the diagnosis of primary and secondary (pituitary) hypothyroidism (1,2).

Increase in serum concentrations of TSH, which is primarily responsible for the synthesis and release of thyroid hormones, is an early and sensitive indicator of decrease thyroid reserve and in conjunction with decreased thyroxine (T4) concentrations is diagnostic of primary hypothyroidism. The expected increase in TSH concentrations demonstrates the classical negative feedback system between the pituitary and thyroid glands. That is, primary thyroid gland failure reduces secretion of the thyroid hormones, which in turn stimulates the release of TSH from the pituitary.

Additionally, TSH measurements are equally useful in differentiating secondary and tertiary (hypothalamic) hypothyroidism from the primary thyroid disease. TSH release from the pituitary is regulated by thyrotropin releasing factor (TRH), which is secreted by the hypothalamus, and by direct action of T4 and triiodothyronine (T3), the thyroid hormones, at the pituitary. Increase levels of T3 and T4 reduces the response of the pituitary to the stimulatory effects of TRH. In secondary and tertiary hypothyroidism, concentrations of T4 are usually low and TSH levels are generally low or normal. Either pituitary TSH deficiency (secondary hypothyroidism) or insufficiency of stimulation of the pituitary by TRH (tertiary hypothyroidism) causes this. The TRH stimulation test differentiates these conditions. In secondary hypothyroidism, TSH response to TRH is blunted while a normal or delayed response is obtained in tertiary hypothyroidism.

Further, the advent of immunoenzymometric assays has provided the laboratory with sufficient sensitivity to enable the differentiating of hyperthyroidism from euthyroid population and extending the usefulness of TSH measurements. This method is a second-generation assay, which provide the means for discrimination in the hyperthyroid-euthyroid range.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDITEC TSH ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with a monoclonal [mouse] antibody directed towards a unique antigenic site of the TSH molecule. An aliquot of patient sample containing endogenous TSH is incubated in the coated well with enzyme conjugate, which is an anti-TSH antibody conjugated with horseradish peroxidase. After incubation the unbound conjugate is washed off.

The amount of bound peroxidase is proportional to the concentration of TSH in the sample.

Having added the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the concentration of TSH in the patient sample.

### 3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with *Stop Solution* containing 1 N acidic solution. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents may contain Proclin, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Material Safety Data Sheets.  
Material Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with anti-TSH antibody (monoclonal).
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 vials, 0.4 mL each, ready to use;  
Concentrations: 0 – 0.25 – 0.75 – 2.0 – 5.0 – 15 mIU/L  
*The standards are calibrated against WHO International Standard for TSH IRP (81/565);*  
Contain preservative.
3. **Control Low & High**, 2 vials, 0.4 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain preservative.
4. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 12 mL, ready to use,  
Anti-TSH antibody conjugated to horseradish peroxidase;  
Contains preservative.
5. **Substrate Solution**, 1 vial, 12 mL, ready to use,  
Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use,  
contains 1 N acidic solution,  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **Wash Solution**, 1 vial, 25 mL (40X concentrated),  
see „Preparation of Reagents“.

**Note:** Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

### 4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate calibrated reader ( $450 \pm 10$  nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for two months if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

#### **Wash Solution**

Add deionized water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 25 mL of concentrated *Wash Solution* with 975 mL deionized water to a final volume of 1000 mL.

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

### 4.6 Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

## 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum can be used in this assay.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

Do not use haemolytic, icteric or lipaemic specimens.

Please note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

### 5.1 Specimen Collection

#### Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for Serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 5 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up 30 days) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

### 5.3 Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

#### Example:

- a) dilution 1:10:           10 µL sample + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100:       10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

## 6 ASSAY PROCEDURE

### 6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

### 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **25 µL** of each **Standard, Control** and **sample** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **10 minutes** at room temperature.
4. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
5. Incubate for **90 minutes** at room temperature.
6. Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with diluted *Wash Solution* (300 µL per well). Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
7. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate for **20 minutes** at room temperature.
9. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the absorbance (OD) of each well at **450 ± 10 nm** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 5 minutes** after adding the *Stop Solution*.

Preferably readings should take place immediately after stopping the reaction since the OD<sub>450</sub> may slightly decrease with the course of time.

### 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 15 mIU/L. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard	Optical Units (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/L)	0.01
Standard 1 (0.25 mIU/L)	0.04
Standard 2 (0.75 mIU/L)	0.11
Standard 3 (2.0 mIU/L)	0.32
Standard 4 (5.0 mIU/L)	0.81
Standard 5 (15.0 mIU/L)	2.27

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

The German guideline for thyroid diagnostics recommends a normal range from 0.3 to 4.0 mIU/L. A correlation study between Abbott Architect system parameter TSH and TSH DE4171 Test system with 70 specimens shows a normal range for the TSH DE4171 Test system of 0.5 to 5.0 mIU/L (Abbott: 0.35 to 4.94 mIU/L).

Serum thyrotropin concentration is dependent upon a multiplicity of factors: hypothalamus gland function, thyroid gland function, and the responsiveness of pituitary to TRH. Thus, thyrotropin concentration alone is not sufficient to assess clinical status.

Genetic variations or degradation of intact TSH into subunits may affect the binding characteristics of the antibodies and influence the final result. Such samples normally exhibit different results due to the reactivity of the antibodies involved.

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

## 8 QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.



## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.06 – 15 mIU/L.

### 9.2 Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The cross-reactivity of the TSH ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations.

No cross-reactions were found when testing up to  
 100,000 mIU/mL Chorionic Gonadotropin (hCG)  
 100 mIU/mL Follicle Stimulating Hormone (hFSH)  
 100 mIU/mL Luteinizing Hormone (hLH)

### 9.3 Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by adding 2 standard deviations to the mean of 20 replicate analyses of the Zero Standard (S0) and was found to be 0.06 mIU/L.

### 9.4 Reproducibility

#### 9.4.1 Intra Assay

The within assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (mIU/L)	CV (%)
1	18	0.95	3.88
2	18	3.26	3.16
3	18	8.79	3.36

#### 9.4.2 Inter Assay

The between assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (mIU/L)	CV (%)
1	4	1.18	9.17
2	4	3.29	5.33
3	4	9.05	3.32

### 9.5 Comparison Studies

Correlation between Abbott Architect system parameter TSH and TSH DE4171 Test system

		Abbott Architect (TSH)	
		pos	neg
TSH DE4171 Test	pos	17	0
	neg	7	46

n : 70  
 sensitivity : 70,8%  
 specificity : 100%  
 pos. PDW : 100%  
 neg. PDW : 86,8%

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), Bilirubin (up to 0.5 mg/mL) and Triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

### 10.2 Drug Interferences

Serum thyrotropin values may be elevated by pharmacological intervention. Domperidone, amiodazon, iodide, phenobarbital, and phenytoin have been reported to increase TSH levels. A decrease in thyrotropin values has been reported with the administration of propranolol, methimazol, dopamine and d-thyroxine (4).

### 10.3 High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test up to 2000 mIU/L of TSH.

## 11 LEGAL ASPECTS

### 11.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

### 11.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 11.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." *Journal Biological Chemistry*, 173, 175, (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyrotropin," *J. Clinical Endocrinology*, 33, 865 (1971).
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests." *Clinical Chemistry*, 21, 3660 (1975).
4. Spencer, CA, et al., "*Clinical Chemistry*, "Interlaboratory/Intermethod differences in Functional Sensitivity of Immunometric Assays of Thyrotropin (TSH) and Impact on Reliability of Measurement of Subnormal Concentrations of TSH", 41, 367 (1995).

## 1 EINLEITUNG

Der **DEMEDIATEC TSH ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von TSH (Thyreoida-stimulierendes Hormon) in Serum eingesetzt.

**Nur für In-vitro Diagnostik.**

**NICHT FÜR NEUGEBOREN-SCREENING GEEIGNET!**

## 2 TESTPRINZIP

Der DEMEDIATEC TSH ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der Sandwichtechnik basiert.

Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem monoklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine definierte Antikörper-Bindungsstelle des TSH -Moleküls gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und mit einem Enzymkonjugat inkubiert. Das Konjugat enthält einen anti-TSH -Antikörper, der mit Meerrettichperoxidase konjugiert ist. Es wird ein Sandwichkomplex gebildet.

Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional der TSH-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Materialsi-cherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet wer- den.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 1 N saure Lösung enthält. Saure Lösung kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff- Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergeb- nisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Materialsiherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti-TSH-Antikörper (monoklonal) beschichtet.
2. **Standard (Standard 0 - 5)**, 6 Fläschchen, je 0,4 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 0 – 0.25 – 0.75 – 2.0 – 5.0 – 15 mIU/L  
*Die Standards sind kalibriert gegen den Internationalen WHO-Standard für TSH IRP (81/565).*  
Enthält Konservierungsmittel.
3. **Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, je 0,4 mL; gebrauchsfertig  
Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.  
Enthält Konservierungsmittel.
4. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 12 mL, gebrauchsfertig;  
Anti-TSH-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 12 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
6. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 1 N saure Lösung,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 25 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

**Anmerkung:** Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (mit  $450 \pm 10$  nm Filter)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipette
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits zwei Monate ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

#### **Wash Solution**

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (25 mL) mit 975 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 mL verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

### 4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Materialsicherheitsdatenblatt, Kapitel 13.

### 4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

## 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Zum genauen Vergleich mit etablierten Normwerte, sollte die Serumprobe am Morgen vor der ersten Mahlzeit gewonnen werden.

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

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

### 5.1 Probenentnahme

#### Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 5 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 30 Tagen) sollten die Proben eingefroren bei –20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

### 5.3 Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

#### Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

## 6 TESTDURCHFÜHRUNG

### 6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

### 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 25 µL Standard, Control und Probe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **10 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
4. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
5. **90 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
6. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **5-mal** mit verdünnter *Wash Solution* (300 µL) waschen. Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:**  
Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
7. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
8. **20 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei **450 ± 10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **5 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.  
Vorzugsweise sollte das Ablesen sofort nach Zugabe der Stopplösung stattfinden, da die OD<sub>450</sub> mit der Zeit leicht absinkt.

### 6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4 PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Standard 0 (0 mIU/L)	0,01
Standard 1 (0.25 mIU/L)	0,04
Standard 2 (0.75 mIU/L)	0,11
Standard 3 (2.0 mIU/L)	0,32
Standard 4 (5.0 mIU/L)	0,81
Standard 5 (15.0 mIU/L)	2,27

## 7 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt. Die Deutsche Richtlinie für die Schilddrüsendiagnostik empfiehlt einen Normbereich von 0,3 – 4,0 mIU/L.

Eine Vergleichsstudie für den Systemparameter TSH zwischen dem Abbott Architect und dem DEMEDITEC DE4171 mit 70 Proben ergab einen Normbereich von 0,5 – 5,0 mIU/L für den DEMEDITEC DE4171 und von 0,35 – 4,94 mIU/L für den Abbott Architect.

Die Konzentration von Thyrotropin im Serum wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst: einerseits durch die Drüsenfunktion von Hypothalamus und Schilddrüse sowie durch das Ansprechen der Hypophyse auf TRH. Deshalb ist die Konzentration von Thyrotropin allein nicht ausreichend, um den klinischen Status zu erfassen.

Genetische Variationen oder Abbau von intaktem TSH in seine Untereinheiten können die Bindungseigenschaften der Antikörper beeinflussen und sich auf das Ergebnis auswirken. Solche Proben ergeben auf Grund veränderter Antikörperbindung normalerweise andere Ergebnisse.

## 8 QUALITÄTS-KONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden. Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern.

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.



## 9 ASSAY CHARACTERISTIKA

### 9.1 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0.06 – 15 mIU/L.

### 9.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

### 9.3 Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 0.06 mIU/L.

Die Daten zu:

### 9.4 Reproduzierbarkeit (Präzision)

### 9.5 Wiederfindung

### 9.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## 10 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

### 10.1 Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0.5 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### 10.2 Beeinflussung durch Medikamente

Serumwerte für Thyrotropin können unter Medikamenteneinfluss erhöht sein.

Die Erhöhung des TSH-Spiegels durch Domperidon, Amiodazon, Jod, Phenobarbital und Phenytoin wurde beschrieben.

Hingegen werden die Thyrotropinwerte durch Gabe von Propanolol, Methimazol, Dopamin und D-Thyroxin gesenkt (4).

### 10.3 High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook Effekt tritt bei Proben mit bis zu 2000 mIU/L TSH nicht auf.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen.

Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**











Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## **12 REFERENZEN / LITERATUR**

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

## SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostique in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de microtitration	Placas multipocillo	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1N HCl	1 N HCl	
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluyente del tracciante