

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

TSH canine ELISA

VET

REF

DEV9955



96 Wells

CONTENTS

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS.....	5
5	SPECIMEN.....	6
6	ASSAY PROCEDURE.....	6
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	8
8	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	8
9	EFFECT OF ANTICOAGULANTS.....	10
10	REFERENCES.....	10
11	SHORT INSTRUCTION	11

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	12
2	TESTPRINZIP	12
3	HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	KITBESTANDTEILE	14
5	PROBENENTNAHME UND -VORBEREITUNG.....	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	NORMALWERTE	17
8	TESTCHARAKTERISTIKA.....	18
9	EFFEKTE VON ANTIKOAGULANTIEN	20
10	REFERENZEN	20
11	KURZANLEITUNG	21
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA	22

1 INTRODUCTION

1.1 INTENDED USE

The Demeditec TSH canine ELISA is an enzyme immunoassay for the quantitative measurement of canine TSH (thyrotropin).

1.2 SUMMARY AND EXPLANATION

Thyroid stimulating hormone (TSH, thyrotropin) in dogs is similar in function to TSH found in other mammalian species, including humans. It is a glycoprotein produced by the anterior pituitary gland. Through its action on the thyroid gland, it plays a major role in maintaining normal circulating levels of the iodothyronines, T4 and T3. The production and secretion of TSH is controlled by negative feedback from circulating T4 and T3, and by the hypothalamic hormone TRH (thyrotropin releasing hormone). The TSH molecule is composed of two nonidentical subunits, α and β , that are bound together in a noncovalent manner. Within a species, the TSH α subunit is structurally identical to the α subunits of the related glycoprotein hormones (LH, FSH and chorionic gonadotropin). The β subunit of TSH and the β subunits of the related hormones are structurally hormone-specific, and confer upon them their unique biological activities.

Hypothyroidism is considered to be a common endocrine disorder in dogs, whereas hyperthyroidism in this species is nearly unknown. Most cases of canine hypothyroidism are primary in nature, involving impaired production of the thyroid hormones, T4 and T3. In this condition, elevated TSH levels are expected. Secondary or tertiary hypothyroidism, where thyroid hormone production is low as a consequence of hypothalamic or pituitary disease, is believed to account for less than 5% of canine hypothyroidism cases. In the latter conditions, lowered levels of TSH would be expected. Usually, hypothyroidism in dogs is suspected on the basis of clinical history and the presence of lowered levels of thyroid hormones. However, suppressed thyroid hormone levels are nonspecific indicators of the disease, since they are often observed in nonthyroid illnesses. The evaluation of thyroid function and the diagnosis of hypothyroidism in dogs can be greatly improved through the use of the valid assay for the determination of canine TSH.

2 PRINCIPLE

The test kit is a solid phase enzyme immunometric assay (ELISA) in the microplate format, designed for the quantitative measurement of canine TSH. The microplate is coated with a monoclonal antibody specific for canine TSH.

Calibrators and samples are pipetted into the antibody coated microplate. Afterwards, a polyclonal horseradish peroxidase-labeled antibody is added. During a two hour incubation sandwich complexes consisting of the two antibodies and the canine TSH is formed. Non-reactive components are removed by a washing step.

A chromogenic substrate, TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine), is added to all wells. During a 30 minutes incubation, the substrate is converted to a colored end product (blue) by the fixed enzyme. Enzyme reaction is stopped by dispensing of hydrochloric acid as stop solution (change from blue to yellow). The color intensity is direct proportional to the concentration of canine TSH present in the sample.

The optical density of the color solution is measured with a microplate reader at 450 nm. Bi-chromatic measurement with a 600 - 690 nm reference filter is recommended.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

All reagents of this test kit are strictly intended for **veterinary research** use only. Use by staff, who is specially informed and trained in methods which are carried out by use of immunoassays. Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.

All reagents should be stored refrigerated at 2 - 8 °C in their original container. Do not interchange kit components from different lots and assays. The expiration dates stated on the labels of the shipping container and all vials have to be observed. Do not use kit components beyond their expiration dates.

Allow all kit components and specimen to reach room temperature (18 – 28 °C) prior to use and mix well. During handling of all kit reagents, control and serum samples observe the existing legal regulations handling potentially infectious materials. Especially the following precautions should be taken:

- do not eat, drink or smoke
- do not pipette by mouth, use safety pipettes
- wear disposable gloves and avoid contact with kit reagents, control and sample material.

The test kit contains components of veterinary origin which were found negative for Hepatitis B surface antigen and HIV (Human Immunodeficiency Virus). Nevertheless, for products derived from human or animal source it cannot be completely guaranteed, that they do not contain the above mentioned, others and not yet known or not diagnosticable pathogens. Sample material of patients (for example serum or plasma) normally used in laboratory determinations are always classified as potentially infectious. According to the same safety guides, kit reagents and control material are to be used. Samples of risk patients should be specially labeled and if necessary be handled in safety work benches (lamina flow bench).

The assay reagents contain against microbial growth preservation substances; avoid contact with skin and/or mucous membranes.

Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidine) substrate solution containing peroxide. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water. Avoid contact with any easily oxidized materials. Extreme temperature changes may cause spontaneous decay of the peroxide. Avoid the contact with the stop solution containing acid. By skin contact, wash thoroughly with water. All instrumentation employed to dispense the stop solution should be thoroughly cleaned after use.

4 REAGENTS

4.1 REAGENTS PROVIDED

1. **Microtiterplate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells, ready to use;
Wells coated with an anti-canine monoclonal TSH antibody.
2. **Canine TSH Calibrators**, 6 vials, lyophilized, reconstitution required;
Highly purified in canine serum. The concentrations are 0, 0.2, 0.46, 1.05, 2.2 and 5.2 ng/ml. **For reconstitution see "Reagent preparation"**.
3. **Enzyme-Labeled anti canine TSH Antibody**, 1 vial, 11 ml, red, ready to use;
contains a horseradish peroxidase-labeled polyclonal anti canine TSH antibody (rabbit), in a buffered solution with preservative.
4. **TMB-Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml each, ready to use;
contains tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide in a buffered matrix.
5. **Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use;
contains 2 M Hydrochloric Acid solution.
6. **Wash Buffer Concentrate**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see „Reagent preparation“.

4.2 MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Microplate reader capable for endpoint measurements at 450 nm (optional reference filter in the range of 600 - 690 nm)
- Vortex mixer
- Microplate mixer operating at 600 – 900 rpm
- Distilled water
- Graduated cylinders for 500 ml
- Plastic containers for storage of the wash solution
- Adjustable pipette for up to 1000 µl
- Dispenser or repeatable pipet for 100 µl and 200 µl

4.3 REAGENT PREPARATION

Wash Buffer:

Dilute with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml.

Calibrators:

Reconstitute lyophilized Calibrators A through F with **1.0 ml dist. water** 30 minutes before use.

4.4 STORAGE CONDITIONS

When stored at 2°C to 8°C all reagents are stable until expiration date or 30 days after opening.

The Stop Solution is stable up to 2 months after opening or until the expiration date.

The Wash Solution is stable for 3 months after dilution or until the expiration date.

Store Calibrators refrigerated, it will be stable at 2°C to 8°C for 7 days after reconstitution or until expiration date. For longer storage freeze at -20°C.

Protect Divisible Microplate from moisture. Store together with desiccant and carefully sealed in the plastic bag.

Protect TMB-Substrate Solution from light.

5 SPECIMEN

For determination of canine TSH serum and EDTA plasma are the preferred sample matrices. The procedure calls for 100 µl sample per well. The samples may be stored refrigerated at 2 - 8 °C for 1 week, or up to 2 months at -20 °C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Samples expected to contain canine TSH concentrations higher than the highest calibrator 6 should be diluted in the Canine TSH Zero Calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 GENERAL REMARKS

- Do not interchange components of different lots.
- All components should be at room temperature (18 – 28 °C) before use.
- All components of these test kits, supplied as concentrate should be diluted to their final concentration at least 30 minutes prior to use. Mix well, but prevent of foam formation.
- Use a disposable-tip micropipette to dispense plasma samples. Pipet directly to the bottom of the wells. Change the tip between samples, to avoid carryover contamination.

6.2 ASSAY PROCEDURE

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators (A through F) and patient samples in duplicates.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P3	P..								
b	A	E	P3	P..								
c	B	F	P4									
d	B	F	P4									
e	C	P1	P5									
f	C	P1	P5									
g	D	P2	P6									
h	D	P2	P6									

2. Pipet **100 µl** of each **calibrator** and **patient sample** into the wells prepared.
3. Add **100 µl** of **Enzyme-Labeled Anti-Canine TSH antibody** to all wells.
4. Rotate for **2 hours** on a plate mixer (600 – 900 rpm).
5. Discard the content of the wells and wash **4 times** with **300 µl buffered wash solution**. Remove as much wash solution as possible by beating the microplate carefully.
6. Add **200 µl** of **TMB/Substrate Solution** to all wells.
7. Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
8. Add **50 µl** of **Stop Solution** to each well and mix carefully.
9. Read the optical density at **450 nm**. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.

The developed color is stable for at least 15 minutes. Read optical densities during this time.

6.3 CALCULATION OF RESULTS

For evaluation of Demeditec TSH canine a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density (linear scale) and concentration (logarithmic scale) is recommended.

Spline approximation with lin-log coordinates and log-log coordinates are also suitable.

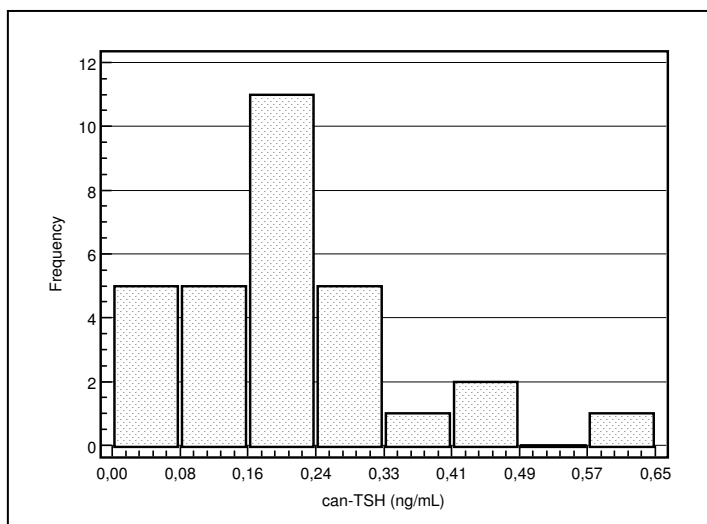
6.3.1 EXAMPLE OF TYPICAL CALIBRATOR CURVE

The figure below shows typical results for TSH canine test kits. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

	Replicate (OD)	Mean (OD)	Binding (%)	canine TSH (ng/ml)
Calibrators				
A (NSB)	0.085	0.082	-	0
	----- 0.078			
B	0.151	0.151	6.6%	0.2
	----- 0.151			
C	0.278	0.280	12.3%	0.46
	----- 0.282			
D	0.551	0.550	24.1%	1.05
	----- 0.549			
E	1.067	1.072	47%	2.2
	----- 1.076			
F ("MB")	2.301	2.282	100%	5.2
	----- 2.262			

7 EXPECTED NORMAL VALUES

Blood was collected from 30 apparently healthy dogs. A mean canine TSH value of 0.216 ng/ml was found, with an absolute range of 0.017 to 0.591 ng/ml.



**Frequency distribution of canine TSH in serum of healthy blood donors
(median = 0,198 ng/ml, 95 % Percentile = 0,48 ng/ml)**

Laboratories should consider reference range limits *as guidelines only*. Because of differences which may exist between laboratories and locales with respect to population, laboratory technique and selection of reference groups, it is important for each laboratory to establish by similar means the appropriateness of adopting the reference range suggested here.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 ANALYTICAL SENSITIVITY

The assay's detection limit, defined as the concentration two standard deviations above the response at zero dose, is approximately 0.01 ng/ml.

8.2 SPECIFICITY

The antibodies used in the Demeditec TSH canine kit are highly specific for canine TSH, with no detectable crossreactivity to other hormones that may be present in canine serum samples.

8.3 REPRODUCIBILITY

Statistics for Coefficients of variation (CV) were calculated for each of four samples from the results of 10 determinations in a single run for Intra-Assay precision and the Inter-Assay precision was calculated from the results of 10 different runs of four samples:

Intra-Assay		
Sample No	Mean \bar{x} (ng/ml)	CV (%)
1	0.53	5.7
2	0.96	3.1
3	1.9	6.8
4	2.8	5.7

Inter-Assay		
Sample No	Mean \bar{x} (ng/ml)	CV (%)
1	0.54	5.6
2	0.88	8.0
3	1.9	6.8
4	2.6	5.4

8.4 RECOVERY

Three spiking solutions were prepared using the Zero Calibrator (8, 16, and 32 ng/ml, respectively). A 50 µl aliquot of each solution (A, B, C) was spiked into 950 µl aliquots of three different low concentration serum samples, for a spiking ratio of 1 to 19, leaving the serum matrix of the spiked samples relatively intact. All samples were then assayed by the Demeditec TSH canine procedure.

Sample	Diluted Solution	measured Concentration [ng/ml]	expected Concentration [ng/ml]	Recovery [%]
1	-	0.1	-	-
	A	0.49	0.5	98
	B	0.91	0.9	101
	C	1.7	1.7	100
2	-	0.45	-	-
	A	0.81	0.85	95
	B	1.22	1.25	98
	C	1.94	2.05	95
3	-	0.83	-	-
	A	1.20	1.23	98
	B	1.60	1.63	98
	C	2.30	2.43	95

The results confirm that the Demeditec TSH canine kit yields an accurate measure of canine TSH throughout its working range.

8.5 LINEARITY

In dilution experiments sera with high antibody concentrations were diluted with the zero calibrator and assayed in the Demeditec TSH canine kit. The assay showed linearity over the full measuring range.

Sample	Dilution Factor	measured Concentration	expected Concentration	Recovery [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	8 in 8	3.4	-	-
	4 in 8	1.8	1,7	106
	2 in 8	0.8	0.85	94
	1 in 8	0.4	0.43	93
2	8 in 8	3.0	-	-
	4 in 8	1.6	1.5	107
	2 in 8	0.72	0.75	96
	1 in 8	0.38	0.38	100
3	8 in 8	3.0	-	-
	4 in 8	1.7	1.5	113
	2 in 8	0.8	0.75	107
	1 in 8	0.38	0.38	100

9 EFFECT OF ANTICOAGULANTS

To determine whether anticoagulants interfere with the assay, five sera/plasma pairs were collected at the same time. All samples were assayed by the Demeditec TSH canine procedure, with the following results.

	Serum	EDTA plasma
1	0.13	0.09
2	ND	ND
3	0.08	0.07
4	0.10	0.09
5	0.20	0.20

ND denotes non-detectable

10 REFERENCES

- Ruschig, S., Kraft, W.
Bestimmung von caninem Thyroidea-stimulierendem Hormon (cTSH) im Blutserum des Hundes und seine Reaktion im TRH-Stimulationstest.
Tierärztl Prax 1996; 24: 479-483.
- Iversen, L., Hoier, R., Jensen, A.L., Skydsgaard, M., Koch, J.
Evaluation of the analytical performance on an enzyme immunometric assay (EIA) designed to measure endogenous thyroid-stimulating hormone (TSH) in canine serum samples.
J. Vet. Med. A 45 (1998): 93-98.
- Ramsey, I.K., Evans, H., Herritage, M.E.
Thyroid-stimulating hormone and total thyroxine concentrations in euthyroid, sick euthyroid and hypothyroid dogs.
Small Animal Practice 38 (1997): 540-545.
- Cortese, L., Oliva, G., Verstegen, J., Ciaramella, P., Persechino, A.
Hyperprolactinaemia and galactorrhoea associated with primary hypothyroidism in a bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 572-575.

11 SHORT INSTRUCTION(all sample sizes given in μL)

MP Well		A	B	C	D	E	F	Sample
	ng/ml	0	0.20	0.46	1.05	2.20	5.20	
Steps	Solution							
Pipet	Calibrator	100	100	100	100	100	100	-
Pipet	Sample	-	-	-	-	-	-	100
Pipet	Enzyme-labeled Canine TSH antibody	100	100	100	100	100	100	100
Incubate for 2h at RT on a shaker								
Decant Wash 4x with 300 μL of buffered wash solution								
Pipet	Substrate Solution	200	200	200	200	200	200	200
Incubate for 30 min at RT in the dark								
Pipet	Stop Solution	50	50	50	50	50	50	50
Read at $\lambda = 450 \text{ nm}$								

1 EINLEITUNG

1.1 VERWENDUNG

Der Demeditec TSH canine ELISA ist ein Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Hunde-TSH (Thyreoid-stimulierendes Hormon).

1.2 ZUSAMMENFASSUNG UND ERLÄUTERUNG

Bei Hunden weisen die Schilddrüse-steuernden Hormone (TSH, Thyreotropin) einen ähnlichen Regelmechanismus auf wie bei anderen Säugetieren, Menschen eingeschlossen. Es handelt sich um ein Glykoprotein, das in der Vorderdrüse der Hypophyse gebildet wird. Durch seine Einwirkung auf die Schilddrüse spielt es eine Hauptrolle bei der Aufrechterhaltung des normalen Spiegels von T3 und T4 in der Zirkulation. Die Bildung und Freisetzung von TSH wird durch die negative Rückkopplung von zirkulierendem T3 und T4 kontrolliert sowie durch das hypothalamische Hormon TRH (Thyreotropin ausschüttendes Hormon). Das TSH-Molekül wird aus zwei nicht-identischen Untereinheiten gebildet, α und β , die auf eine nicht-kovalente Weise miteinander verbunden sind.

Innerhalb einer Spezies ist die TSH α -Untereinheit strukturell identisch mit der α -Untereinheit der verwandten Glykoprotein-Hormone (LH, FSH und Choriongonadotropin). Die β -Untereinheit von TSH und die β -Untereinheiten von verwandten Hormonen sind strukturell hormon-spezifisch und verleihen diesen ihre einzigartige biologische Wirksamkeit.

Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose) ist eine bei Hunden häufig auftretende endokrine Störung, wohingegen Hyperthyreose bei diesen Tieren nahezu unbekannt ist. Viele Fälle von Hunde betreffenden Schilddrüsenüberfunktionen sind primär naturbedingt, wobei die beeinträchtigte Produktion von Schilddrüsen-Hormonen eine Rolle spielt.

Unter diesen Bedingungen sind erhöhte TSH-Werte zu erwarten. Man nimmt an, dass eine sekundäre oder tertiäre Hypothyreose, bei der die Produktion der Schilddrüsen-Hormone als Folge der hypophysären oder hypothalamischen Schädigung niedrig ist, in weniger als 5% als Ursache der Schilddrüsen-Unterfunktion von Hunden anzusehen ist. Bei letzteren Fällen wäre ein erniedrigter TSH-Spiegel zu erwarten. Normalerweise wird eine Hypothyreose bei Hunden auf der Basis der klinischen Vorgeschichte und dem Vorhandensein von niedrigen Werten der Schilddrüsen-Hormonen vermutet. Dennoch sind niedrige Level von Schilddrüsen-Hormonen nicht-spezifische Indikatoren einer Erkrankung, zumal sie oft bei nicht-schilddrüsenbedingten Krankheiten beobachtet werden können. Die Beurteilung der Schilddrüsenfunktion und die Diagnose von Hypothyreose bei Hunden kann durch die Verwendung des Tests für die Bestimmung von Hunde-TSH erheblich verbessert werden.

2 TESTPRINZIP

Der vorliegende Test ist ein Enzymimmunoassay (ELISA) im Mikrotiterplatten-Format mit einer Flüssigphasen-Inkubation zur quantitativen Bestimmung von Hunde-TSH im Serum oder Plasma. Die Festphase ist mit monoklonalen Antikörpern gegen Hunde-TSH beschichtet (1. Antikörper).

Standards und Patientenproben werden in die mit Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wird ein enzymmarkierter polyklonaler Antikörpern zugegeben. Während der zweistündigen Inkubation bildet sich ein Sandwich-Komplex aus den zwei Antikörpern und dem Hunde-TSH. Nach Abschluss der Reaktion werden überschüssige Bestandteile durch Waschen entfernt.

Zugegebenes Substrat, 3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin (TMB), wird anschließend vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt (blau) umgesetzt. Die Enzymreaktion wird nach 30 Minuten durch Zugabe von Salzsäure beendet (Farbumschlag blau \rightarrow gelb).

Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Konzentration des Hunde-TSH in den Standards oder den Proben direkt proportional. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilter-Wellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

3 HINWEISE UND VORSICHTSMAßNAHMEN

Alle Reagenzien dieser Testpackung dürfen ausschließlich zur **Veterinär-Forschung** verwendet werden. Die Anwendung sollte durch Personal erfolgen, das speziell in Immunoassay-Verfahren unterrichtet und ausgebildet wurde.

Die Einhaltung des vorgeschriebenen Protokolls zur Durchführung des Tests ist unbedingt erforderlich.

Die Lagerung der Kitreagenzien sollte gekühlt bei 2 - 8°C in den Originalflaschen erfolgen. Einzelne Komponenten verschiedener Chargen und Testbestecke sollten nicht ausgetauscht werden. Die auf der Verpackung und den Etiketten der einzelnen Komponenten angegebenen Verfallsdaten sind zu beachten. Verfallene Kitbestandteile nicht benutzen.

Alle Testkomponenten vor Testbeginn auf Raumtemperatur (18 - 28 °C) bringen und gut durchmischen. Für den Umgang mit Kitreagenzien, Kontroll- und Patientenproben sind die Vorschriften zur Unfallverhütung für den Gesundheitsdienst beim Umgang mit potentiell infektiösem Material einzuhalten. Insbesondere sind folgende Vorsichtsmaßregeln zu beachten:

- nicht essen, trinken oder rauchen
- nicht mit dem Mund pipettieren, Sicherheitspipetten verwenden
- Handschuhe tragen und Kontakt mit Reagenzien, Kontrollproben und Untersuchungsmaterial vermeiden

In diesem Testbesteck enthaltene Reagenzien veterinären Ursprungs erwiesen sich bei der Prüfung auf Hepatitis B Oberflächen-Antigen und HIV (Human Immuno-deficiency Virus) als negativ. Dennoch ist bei Produkten menschlichen oder tierischen Ursprungs nie mit letzter Sicherheit auszuschließen, dass die genannten, andere oder ggf. noch nicht bekannte oder diagnostizierbare Krankheitserreger enthalten sind.

Untersuchungsmaterial von Patienten (z.B. Plasma- oder Serumproben), wie es für Laboratoriumsuntersuchungen eingesetzt wird, ist stets als potentiell infektiös einzustufen. Unter den gleichen Sicherheitsvorkehrungen sind ebenso Kitreagenzien und Kontrollproben zu handhaben. Proben von Risikopatienten sollten stets besonders gekennzeichnet werden und ggf. in Sicherheitswerkbänken (z. B. Laminar Flow-Arbeitsplatz) bearbeitet werden.

Die Reagenzien dieses Testbestecks enthalten zum Schutz gegen mikrobakterielles Wachstum Konservierungsmittel; daher ist die Berührung mit der Haut und /oder Schleimhäuten zu vermeiden.

Ein Kontakt mit der Peroxid enthaltenden TMB (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) Substratlösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Vermeiden Sie den Kontakt mit leicht oxidierbaren Materialien. Extreme Temperaturschwankungen können zum spontanen Zerfall des Peroxids führen.

Ein Kontakt mit der säurehaltigen Stopp-Lösung ist zu vermeiden. Bei Hautkontakt unverzüglich und kräftig mit Wasser abwaschen. Alle Geräte, die zur Verteilung der Stopp-Lösung verwendet wurden, sofort nach Gebrauch gründlich reinigen.

4 KITBESTANDTEILE

4.1 MITGELIEFERTE KOMPONENTEN

1. **Teilbare Mikrotiterplatte** 12 x 8 (teilbar) Streifen mit 96 Vertiefungen, gebrauchsfertig; beschichtet mit einem monoklonalen anti-Hunde-TSH-Antikörper
2. **Hunde TSH Standards**, 6 Fl., lyophilisiert, Auflösung erforderlich; enthält hoch-aufgereinigtes Hunde-TSH in Serum/Puffer-Matrix. Die Konzentrationen sind 0, 0.2, 0.46, 1.05, 2.2 und 5.2 ng/ml. Informationen zur Rekonstitution erhalten Sie unter Kapitel 4.3 „Vorbereitung der Reagenzien“.
3. **Enzym-markierter Hunde-TSH Antikörper (Kaninchen)**, 1 Fl., 11 ml, rot, gebrauchsfertig; enthält polyklonalen Antikörper, markiert mit Meerrettichperoxidase, in gepufferter Lösung
4. **TMB-Substratlösung**, 1 Fl., 22 ml, gebrauchsfertig; (3,3',5,5'-Tetra-Methyl-Benzidin) in gepufferter Peroxid-Lösung
5. **Stopp-Lösung**, 1 Fl., 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 M Salzsäure.
6. **Waschlösung**, 1 Fl., 50 ml (10X konzentriert) siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

4.2 ERFORDERLICHE MATERIALIEN

- Mikrotiter-Platten-Photometer mit optischem Filter für 450 nm, optional mit Referenzwellenlänge von 600 - 690 nm
- Wirbelmischer (Vortex)
- Mikrotiterplatten-Schüttler (600 – 900 Upm)
- destilliertes Wasser
- Messzylinder für 500 ml
- Plastikgefäße zur Aufbewahrung des Waschpuffers
- variable Mikropipette für bis zu 1.000 µl
- Dispenser bzw. Mehrkanalpipette für 100 µl and 200 µl

4.3 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Waschlösung:

Waschlösung mit 450 ml dest. Wasser auf 500 ml auffüllen.

Standards:

Standards A bis F mit **1,0 ml dest. Wasser** 30 Minuten vor Gebrauch auflösen.

4.4 LAGERUNG DER REAGENZIEN

Bei einer Lagerung bei 2°C bis 8°C sind alle Komponenten bis zum angegebenen Verfallsdatum oder 30 Tage nach dem Öffnen haltbar.

Die Stopp-Lösung ist bis zu 2 Monate nach dem Öffnen oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Die Waschlösung ist bis zu 3 Monate nach der Verdünnung oder bis zum Verfallsdatum haltbar.

Lagern Sie die Standards tiefgefroren, nach dem Auflösen sind diese bei 2°C bis 8°C bis zu 7 Tage haltbar; für längere Aufbewahrung aliquotieren und bei -20 °C aufbewahren.

Schützen Sie die Mikrotiterplatte vor Feuchtigkeit. Zusammen mit dem Trocknungsmittel in dem verschließbaren Beutel aufbewahren.

Schützen Sie die TMB-Substrat-Lösung vor Licht.

5 PROBENTNAHME UND -VORBEREITUNG

Die Bestimmung des Hunde-TSH wird in Serum oder Plasma durchgeführt. Es wird 100 µl pro Einzelbestimmung benötigt.

Die Proben können für eine Woche gekühlt bei 2°- 8°C oder bis zu 2 Monaten gefroren bei -20 °C gelagert werden. Ist eine längere Lagerung beabsichtigt, sollten die Proben aliquotiert und tiefgefroren werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

Proben, deren Konzentration an Hunde-TSH höher als der höchste Standardwert 5 liegen könnte, sollten vor der Abarbeitung im Hunde-TSH Null-Kalibrator vorverdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnungsstufe ist bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 ALLGEMEINE ANMERKUNGEN

- Die Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Alle Komponenten auf Raumtemperatur (18 – 28 °C) bringen.
- Die als Konzentrat gelieferten Reagenzien müssen mindestens 30 Minuten vor Gebrauch auf ihre Endkonzentration verdünnt werden. Gut mischen, aber Schaumbildung vermeiden.
- Zum Vorlegen der Plasmaproben sollten Pipetten mit Einmalspitzen verwendet werden. Direkt auf den Boden der Vertiefungen pipettieren. Für jede Probe die Spitzen wechseln, um Verschleppungen zu vermeiden.

6.2 TESTDURCHFÜHRUNG

1. Eine ausreichende Anzahl an Vertiefungen der Mikrotiterplatte zum Ansatz von Standards und Proben in Doppelbestimmung vorbereiten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
a	A	E	P3	P..								
b	A	E	P3	P..								
c	B	F	P4									
d	B	F	P4									
e	C	P1	P5									
f	C	P1	P5									
g	D	P2	P6									
h	D	P2	P6									

2. Zur Bestimmung von Hunde-TSH jeweils **100 µl Standards** und **Proben** entsprechend der Plattenbelegung auf den Boden der Vertiefungen pipettieren.
3. **100 µl Enzym-markierten Hunde-TSH Antikörper** in jede Vertiefung pipettieren.
4. **2 Stunden** bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) auf einem Plattenschüttler (600 – 900 Upm) inkubieren.
5. Platte dekantieren und **4 mal** jeweils mit **300 µl Waschpuffer** waschen. Restliche Flüssigkeit sorgfältig durch Ausklopfen der Platte entfernen.
6. **200 µl TMB-Substratlösung** in jede Vertiefung pipettieren.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur (18 – 28 °C) **im Dunkeln** inkubieren.
11. **50 µl Stopp-Lösung** in jede Vertiefung pipettieren.
12. Optische Dichte bei **450 nm** messen. Bi-chromatische Messung mit einer Referenzfilterwellenlänge im Bereich von 600 - 690 nm ist empfehlenswert.

Die Färbung der Lösung ist mindestens 15 Minuten stabil. In dieser Zeit sollte gemessen werden.

6.3 AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Zur Auswertung des Demeditec TSH canine ELISA ist eine 4-Parameter Logistik mit lin-log-Koordinaten für die optischen Dichte (lineare Achse) und für die Konzentration (logarithmische Achse) die Kurvenanpassung der Wahl.

Eine geglättete Spline-Funktion mit lin-log- oder log-log-Koordinaten ist ebenso möglich.

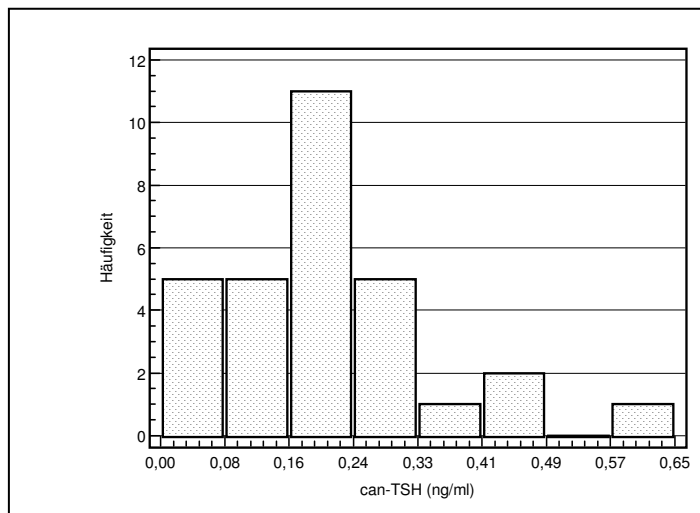
6.3.1 AUSWERTUNGSBEISPIEL

Die folgende Tabelle zeigt typische Messwerte am Beispiel des Demeditec TSH canine Tests. Die Daten dienen nur der Illustration und sind nicht dazu bestimmt, die Ergebnisse eines anderen Testansatzes danach zu berechnen.

	Replikate (OD)	Mittelwert (OD)	Bindung (%)	Hunde-TSH (ng/ml)
Standards				
A	0,085 ----- 0,078	0,082	-	0
B	0,151 ----- 0,151	0,151	6,6%	0,2
C	0,278 ----- 0,282	0,280	12,3%	0,46
D	0,551 ----- 0,549	0,550	24,1%	1,05
E	1,067 ----- 1,076	1,072	47%	2,2
F	2,301 ----- 2,262	2,282	100%	5,2

7 NORMALWERTE

Es wurden Blutproben von 30 gesunden Hunden genommen. Ein mittlerer TSH-Wert von 0,216 ng/ml wurde ermittelt, mit einem absoluten Messbereich von 0,017 bis 0,591 ng/ml.



**Häufigkeitsverteilung von Hunde-TSH im Serum gesunder Blutspender
(Median = 0,198 ng/ml, 95 % Percentile = 0,48 ng/mL)**

Die angegebenen Normalwerte dienen nur zur Orientierung. Da Faktoren wie Population, Labortechnik und Auswahl der Referenzgruppen diese Werte beeinflussen können, ist es wichtig, dass jedes Labor durch ähnliche Mittelwerte überprüft, ob die hier vorgeschlagenen Referenzbereiche dafür geeignet sind, übernommen zu werden.

8 TESTCHARAKTERISTIKA

8.1 SENSITIVITÄT

Die untere Nachweisgrenze des Demeditec TSH canine ELISA, definiert als die Konzentration zweier Standardabweichungen über der Reaktion bei Nulldosierung, liegt maximal bei 0,01 ng/ml.

8.2 SPEZIFITÄT

Die in diesem Test verwendeten Antikörper sind hoch spezifisch für Hunde-TSH; für diese ist keine Kreuzreaktivität mit anderen Hormonen, die im Hundeserum vorliegen könnten, bekannt.

8.3 REPRODUZIERBARKEIT

Nachfolgende Variationskoeffizienten (VK) wurden für die Intra-Assay-Varianz auf der Basis einer 10-fachen Bestimmung von vier Proben ermittelt; für die Inter-Assay-Varianz wurden die Ergebnisse aus 10 Assays für vier Proben ermittelt.

Intra-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
1	0,53	5,7
2	0,96	3,1
3	1,9	6,8
4	2,8	5,7

Inter-Assay		
Proben Nr.	Mittelwert \bar{x} (ng/ml)	Variationskoeffizient (%)
1	0,54	5,6
2	0,88	8,0
3	1,9	6,8
4	2,6	5,4

8.4 WIEDERFINDUNG

Drei Verdünnungslösungen wurden unter Einbeziehung des Null Kalibrators hergestellt (8, 16 und 32 ng/ml). 50 µl jeder Lösung (A, B, C) wurden zu je 950 µl drei verschiedenen Serumproben von Patienten hinzugefügt (Verdünnungsverhältnis von 1:20), um die Serum-Matrix der Proben möglichst intakt zu lassen. Alle Proben wurden dann mit dem Demeditec TSH canine Test gemessen.

Proben Nr.	Lösung	Gemessene Konzentration	Erwartete Konzentration	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	-	0,1	-	-
	A	0,49	0,5	98
	B	0,91	0,9	101
	C	1,7	1,7	100
2	-	0,45	-	-
	A	0,81	0,85	95
	B	1,22	1,25	98
	C	1,94	2,05	95
3	-	0,83	-	-
	A	1,20	1,23	98
	B	1,60	1,63	98
	C	2,30	2,43	95

8.5 LINEARITÄT

In Verdünnungsexperimenten wurden Seren mit hohen Antikörper-Konzentrationen mit dem Null-Kalibrator verdünnt und mit dem Demeditec TSH canine-Assay gemessen. Der Assay ist über den gesamten Messbereich linear.

Sample Nr.	Verdünnung	Gemessene Konzentration	erwartete Konzentration	Wiederfindung [%]
		[ng/ml]	[ng/ml]	
1	8 in 8	3.4	-	-
	4 in 8	1.8	1,7	106
	2 in 8	0.8	0.85	94
	1 in 8	0.4	0.43	93
2	8 in 8	3.0	-	-
	4 in 8	1.6	1.5	107
	2 in 8	0.72	0.75	96
	1 in 8	0.38	0.38	100
3	8 in 8	3.0	-	-
	4 in 8	1.7	1.5	113
	2 in 8	0.8	0.75	107
	1 in 8	0.38	0.38	100

9 EFFEKTE VON ANTIKOAGULANTIEN

Um zu bestimmen, ob Antikoagulantien den Assay stören, wurden fünf Serum/Plasma Proben zum selben Zeitpunkt entnommen. Alle Proben wurden mit dem Demeditec TSH canine Assay gemessen und folgende Ergebnisse ermittelt:

	Serum	Plasma
1	0,13	0,09
2	nn	nn
3	0,08	0,07
4	0,10	0,09
5	0,20	0,20

nn = nicht nachweisbar











10 REFERENZEN







1. Ruschig, S., Kraft, W.
Bestimmung von caninem Thyroidea-stimulierendem Hormon (cTSH) im Blutserum des Hundes und seine Reaktion im TRH-Stimulationstest.
Tierärztl Prax 1996; 24: 479-483.
2. Iversen, L., Hoier, R., Jensen, A.L., Skydsgaard, M., Koch, J.
Evaluation of the analytical performance on an enzyme immunometric assay (EIA) designed to measure endogenous thyroid-stimulating hormone (TSH) in canine serum samples.
J. Vet. Med. A 45 (1998): 93-98.
3. Ramsey, I.K., Evans, H., Herritage, M.E.
Thyroid-stimulating hormone and total thyroxine concentrations in euthyroid, sick euthyroid and hypothyroid dogs.
Small Animal Practice 38 (1997): 540-545.
4. Cortese, L., Oliva, G., Verstegen, J., Ciaramella, P., Persechino, A.
Hyperprolactinaemia and galactorrhoea associated with primary hypothyroidism in a bitch.
Small Animal Practice 38 (1997): 572-575.

11 KURZANLEITUNG(alle Volumenangaben in μl)

MT-Platten-Well	ng/ml	A	B	C	D	E	F	Probe
		0	0,20	0,46	1,05	2,20	5,20	
Schritte	Lösung							
Pipettieren	Standard	100	100	100	100	100	100	-
Pipettieren	Probe	-	-	-	-	-	-	100
Pipettieren	Enzym- markierter Hunde-TSH Antikörper	100	100	100	100	100	100	100
2 Stunden bei RT auf einem Schüttler inkubieren								
Dekantieren 4x mit 300 μl Waschlösung waschen								
Pipettieren	Substrat- Lösung	200	200	200	200	200	200	200
30 min bei RT im Dunkeln inkubieren								
Pipettieren	Stopp-Lösung	50	50	50	50	50	50	50
Messen bei $\lambda = 450 \text{ nm}$								

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consultez le Mode d'emploi	Consulte las Instrucciones	Consulti le istruzioni
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Diagnostica in vitro
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	No de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	For veterinary research use only	Nur für Veterinärforschungszwecke			
	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	Temperature 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	Pocillos de la Microplaca	Micropozzetti
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisero	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 paro	Soluzione d'arresto
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard 0	Standard 0	Standard zero
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Calibrador	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		Diluyente dei campioni
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Solution pour dilution du conjugué		Diluyente del tracciante

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Instruções de uso	Brugermanual	Användar manual	Εγχειρίδιο χρήστη
IVD	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
REF	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
LOT	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
VET				
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevaringstemperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
<i>Distributed by</i>				
<i>Content</i>	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
<i>Volume/No.</i>	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..
<i>Microtiterwells</i>	Alvéolos de microtitulação	Mikrotiterbrønde	Brunnar i Mikrotiterplatta	Πηγαδάκια Μικροτιτλοδοτήσεως
<i>Antiserum</i>	Anti-soro	Antiserum	Antiserum	Αντιορός
<i>Enzyme Conjugate</i>	Conjugado enzimático	Enzymkonjugat	Enzymkonjugat	Συζευγμένο ενζυμο
<i>Enzyme Complex</i>	Complexo enzimático	Enzymkompleks	Enzymkomplex	Σύμπλοκο ενζύμου
<i>Substrate Solution</i>	Solução de substrato	Substratopløsning	Substratlösning	Διάλυμα υποστρώματος
<i>Stop Solution</i>	Solução de paragem	Stopopløsning	Stopp lösning	Διάλυμα τερματισμού
<i>Zero Standard</i>	Padrão zero	Standard 0	Standard 0	Πρότυπο Μηδέν
<i>Standard</i>	Calibrador	Standard	Standard	Πρότυπα
<i>Control</i>	Controlo	Kontrol	Kontroll	Έλεγχος
<i>Assay Buffer</i>	Tampão de teste	Assay buffer	Assay Buffer	Ρυθμιστικό Διάλυμα Εξέτασης
<i>Wash Solution</i>	Solução de lavagem	Vaskebuffer	Tvätt lösning	Διάλυμα πλύσεως
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl	1 N HCl
<i>Sample Diluent</i>				
<i>Conjugate Diluent</i>				