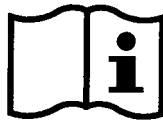


Product information

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



User's Manual

TSH IRMA

Immunoradiometric assay for the in vitro determination of thyroid-stimulating hormone in human serum and plasma

Immunoradiometrischer Assay zur quantitativen Bestimmung des thyreoid-stimulierenden Hormons in humanem Serum und Plasma



REF DE15100/DE15300



100/300 tubes

EINLEITUNG

Das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH, Thyrotropin) ist ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 28.000 Da, das in den thyreotropen Zellen des Hypophysenvorderlappens sezerniert wird und aus zwei Polypeptidketten besteht. Die α -Kette ist fast identisch mit den α -Ketten von LH, FSH & hCG. TSH-spezifisch ist die β -Kette, die auch für die biologische und immunologische Differenziertheit verantwortlich ist. Biologisch wirksam ist nur das Gesamthormon. Die Bildung von TSH wird stimuliert durch das hypothalamische TRH (TSH-Releasing Hormon). Die wichtigste Funktion des TSH ist die Regulation der Synthese und Ausschüttung der Hormone Thyroxin(T4) und Trijodthyronin(T3) über einen negativen Rückkopplungs- Mechanismus. In den thyreotropen Zellen wird T4 zu T3 deiodiert, das dann die TSH- Sekretion inhibiert. Bei einem intaktem hypothalamisch-hypophysärem System verursachen gestörte SD-Hormonspiegel eine veränderte TRH-Ausschüttung und damit ebenfalls eine Veränderung der TSH Sekretion. Ein Mangel an Schilddrüsenhormonen in der Körperperipherie führt zu einem Anstieg der TSH Sekretion und, solange keine Schilddrüsenkrankung vorliegt, zur Zunahme der Synthese und Freisetzung von Schilddrüsenhormonen. Hierbei reagiert die TSH-Konzentration im Serum sehr empfindlich auf kleinste Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen.

So kann bereits ein geringes Absinken der T4-Konzentration innerhalb des Referenzbereiches zu einem deutlichen Anstieg der TSH-Konzentration auf Werte oberhalb des Referenzbereiches führen. Die Bestimmung des TSH ist daher ein sehr sensibler Parameter für die frühzeitige Erkennung von Störungen der Schilddrüsenfunktion.

TESTPRINZIP

Der TSH- Assay basiert auf dem typischen „Sandwichprinzip“, in dem zwei monoklonale Maus-Antikörper gegen 2 verschiedene Epitope gegen TSH verwendet werden. Die Standards bzw. Proben werden in Anwesenheit mit dem I-125 markierten monoklonalen Antikörper und dem an der Röhrchenwand immobilisierten Antikörper inkubiert. Nach der Inkubation werden die Röhrchen zum vollständigen Entfernen des nicht gebundenen Tracer-Antikörpers gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wird anschließend in einem γ -Counter gemessen und über eine IRMA-Auswertungsprogramm berechnet. Die TSH Konzentrationen in den Proben werden durch Interpolation aus der Standardkurve bestimmt. Die TSH-Konzentrationen sind dabei direkt proportional zu der gemessenen Radioaktivität.

HINWEISE

Allgemeinhinweise:

- Die Kalibrator- und Kontrollfläschchen sollten so kurz wie möglich geöffnet werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Jedes Röhrchen darf nur einmal verwendet werden.

Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde. Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Keine Mundpipette verwenden.
- Direkter Kontakt mit radioaktiven Materialien sollte durch Tragen entsprechender Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe) vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muss in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor- und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

Bestandteile menschlichen Ursprungs

Bestandteile menschlichen Ursprungs, die für diesen Kit verwendet wurden, sind auf HIV-1 und HIV-2 Antikörper, HCV Antikörper und Hepatitis B surface Antigen (HbsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden wurden. Es ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr bestünde. Keine Testmethode kann völlige Sicherheit bieten. Der Kit sollte mit allen notwendigen Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Alle Serum- und Plasmaproben sollten als potentielle Überträger von Hepatitis und AIDS behandelt und Abfälle entsprechend den jeweiligen Länderbestimmungen entsorgt werden.

Das Sicherheitsdatenblatt ist unter info@demeditec.de verfügbar

REAGENZIEN

Reagenzienpackung ist ausreichend für 100 Bestimmungen.

Die in der Packung enthaltenen Reagenzien sind bei 2-8°C haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum auf den Etiketten.

Die Reagenzien sind nach dem Öffnen verwendbar bis zum angegebenen Verfallsdatum der Reagenzienpackung, wenn sie bei 2-8°C gelagert werden.

SORB | CT Coated Tubes, gebrauchsfertig:

2(6) x 50 Teströhrchen (Coated Tubes), beschichtet mit monoklonalem Antikörper (Maus) gegen TSH. Die Teströhrchen müssen bei Gebrauch bis zur Angleichung an die Raumtemperatur im Schutzbeutel verbleiben. Unbenutzte Röhrchen sollen in verschlossenen Beuteln trocken bei 2 – 8 °C gelagert werden.

Anti-TSH | I-125 I-125- TSH-Antikörper Tracer, gebrauchsfertig:

1(3) Flasche(n) mit je 11,0 ml I-125 markierte, monoklonale Anti-TSH-Ak Lösung, Aktivität pro Flasche: <515 kBq (Herstellungsdatum) des markierten Immunglobulins in Puffer mit Proteinen, BSA und einen Farbstoff
Stabilisierung mit <0,1% NaN₃.

CAL TSH-Standards 0 bis 6, gebrauchsfertig:

1 Set mit 7 Flaschen mit jeweils 1,0 ml TSH-Standard mit BSA. Der Konzentrationsbereich liegt zwischen 0 und 50 mIU/L. Die exakten Konzentrationen sind dem beiliegenden Datenblatt zu entnehmen. Die Standards wurden gegen die internationale Standard-Präparation WHO 3rd IS 2003 81/565 kalibriert.

Die Standards enthalten Rinderserum und humanes Material. Bitte wie mit potentiell infektiösem Material umgehen. Stabilisierung mit < 0,1% NaN₃.

CONTROL TSH-Kontrollen 1 & 2, lyophilisiert:

2 Flaschen Level 1 & 2, lyophilisiert

Jede Flasche wird mit 1,0 ml Aqua-dest. rekonstituiert.

Die Konzentrationen sind der Packungsbeilage zu entnehmen.

Es wird empfohlen, rekonstituierte Kontrollen aliquotiert bei –20°C aufzubewahren.

WASH | SOLN | 20x Waschlösung, 20 x konzentriert:

1(3) Flasche(n) mit 50,0 ml konzentrierter Waschlösung. Die Waschlösung muss vor Gebrauch auf 1,0 Liter mit Aqua-dest. aufgefüllt werden. Die Lösung ist bei 4°C haltbar bis zum Verfalldatum der Reagenzienpackung. Stabilisierung mit <0,1% NaN₃.

BENÖTIGTES MATERIAL

Zur gewohnten Laborausstattung sind folgende Hilfsmittel notwendig:

- Mikropipette (100µl)
- Multipipette (100µl & 2.0ml)
- Schüttler (mind. 300 - 350 UpM)
- Absaugsystem bzw. Dekantierzubehör
- Gamma-Counter mit IRMA-Auswertemathematik

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Es kann sowohl Plasma als auch Serum eingesetzt werden. Die Proben können bis zu 24 Std. bei 2 – 8°C, für längere Zeit bei –20°C gelagert werden. Mehrmaliges Einfrieren der Proben ist zu vermeiden. Bei zu hohen TSH-Konzentrationen können die Proben mit 0-Standard verdünnt werden.

ASSAYDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

Alle Teströhrchen und Reagenzien auf Raumtemperatur bringen.

Proben vor Gebrauch vorsichtig durchmischen.

Waschkonzentrat auf 1000 ml (1 Liter) Aqua-dest. auffüllen.

Die lyophilisierten Kontrollen 1 & 2 auf Raumtemperatur bringen. Anschließend jedes Fläschchen mit je 1,0 ml Aqua-dest rekonstituieren. Nach 30 Min durchmischen bzw. vortexen. (Die Kontrollen können bis zu 24 Std. bei 2 – 8°C, für längere Zeit bei –20°C gelagert werden.)

Qualitätskontrolle

- Für jeden Testansatz eine eigene Standardkurve erstellen.
- Es liegt in der Verantwortung des Labors Kontrollen und Proben als Doppelbestimmung durchzuführen. Im Rahmen einer verantwortungsvollen Laborarbeit sollten Kontrollseren mitgeführt werden, um die Testdurchführung zu überprüfen.

Ablauf:

- 100 µl Standards, Kontrollen und Proben in die vorbereiteten Coated Tubes pipettieren
- 100 µl I-125-Tracer in alle Röhrchen pipettieren. Zusätzlich zwei separate Röhrchen zur Bestimmung der Totalaktivität mit 100 µl Tracer pipettieren.
- Gründlich mischen (Vortexer) und 1 Stunde bei Raumtemperatur bei mind.300 -350 u/Min schütteln
- Absaugen oder Dekantieren aller Röhrchen. Jedes Röhrchen anschließend mit 2 ml Waschlösung versetzen und nochmals vollständig absaugen oder dekantieren.
- Den Waschvorgang 2 x mal durchführen. Es sollte keine restliche Tracer-Aktivität im Röhrchen verbleiben.
- Messung der Radioaktivität. Empfohlene Messzeit 1 Minute. Vor der Messung sollte der Background kontrolliert werden, da die volle Sensitivität des Tests nur bei minimiertem Background erreichbar ist

ERGEBNISSE**Berechnung**

Die meisten Gamma-Counter verfügen über eigene Auswerteprogramme, mit denen der TSH-Assay ausgewertet werden kann (IRMA – Auswerteprogramm).

Bei der manuellen Auswertung wird folgendermaßen vorgegangen:

Berechnung der Mittelwerte der Counts/Minute aus den Doppelbestimmungen

Berechnung der Prozentualen Bindung der Standards, Kontrollen und Proben zu den Counts/Minute der Totalaktivität nach der Formel:

$$\% \text{Bindung} = \frac{\text{Netto Counts/Minute Std. / Ktrl. / Probe}}{\text{Netto Counts/Minute } B_T} \times 100$$

Die Prozentualen Bindungen der Standards werden möglichst auf semi-logarithmischen Papier auf der y-Achse gegen die Konzentrationen der Standards auf der x-Achse eingetragen und die Punkte durch eine Kurve verbunden. Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können dann aus dieser Kurve ermittelt werden.

Beispiel einer typischen Standardkurve:

Totalaktivität : 193875 cpm				
Standard	mIU/L	Cpm (n=3)	B/ T (%)	B/B _{max} (%)
0	0	48	0,02	0,08
1	0,15	301	0,16	0,50
2	0,50	882	0,46	1,46
3	1,5	2456	1,27	4,06
4	5,0	7799	4,02	12,9
5	15,0	21889	11,3	36,2
6	50,0	60513	31,2	100

Die o.a. Werte dienen nur als Beispiel und dürfen nicht der Laborauswertung eingesetzt werden.

REFERENZWERTE

Euthyreose:	0.2 - 4.0 mIU/L
Hyperthyreose:	≤ 0.15 mIU/L
Unbehandelte Hypothyreose:	> 5.0 mIU/L

Die o.a. Bereiche gelten nur als Richtlinie. Entsprechend den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie sollte jedes Labor eigene Referenzbereiche erstellen.

LEISTUNGSDATEN

(für mehr Details siehe die Beilage "APPENDIX")

Repräsentative Daten dienen nur der Veranschaulichung. Die in einzelnen Labors erzielten Leistungen können anders ausfallen.

Empfindlichkeit

Analytische Sensitivität: 0,04 mIU/L

Funktionelle Sensitivität: 0,141 mIU/L

Spezifität

Der in diesem Immunoassay verwendete Antikörper ist höchst spezifisch für TSH. Extrem niedrige Kreuzreaktionen wurden mit einigen verwandten Molekülen (LH, FSH, hCG, GH, Prolaktin) ermessent.

Präzision

Intra-Assay

Proben aus derselben Serie wurden 10 mal getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 3,7 % für Serumproben.

Inter-assay

Proben aus 16 verschiedenen Serien wurden als Doppelbestimmungen getestet. Der Variationskoeffizient war jeweils weniger oder gleich 8,6 % für Serumproben.

Genauigkeit

Verdünnungstest

Hoch konzentrierte Proben wurden mit Nullkalibrator verdünnt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 92,7 % und 109 %.

Wiederfindungstest

Schwach konzentrierte Proben wurden mit definierten TSH-Mengen vermischt. Die erhaltene Wiederfindung befindet sich zwischen 99,4 % und 107 %.

Meßbereich (von der analytischen Sensitivität bis zum höchsten Kalibrator):

0,04 bis ungefähr 50 mIU/L.

EINSCHRÄNKUNGEN

Die Nichtbeachtung der Anweisungen in dieser Packungsbeilage kann die Ergebnisse signifikant beeinflussen. Die erhaltenen Ergebnisse sind vor dem Hintergrund der gesamten klinischen Situation des Patienten unter Berücksichtigung seiner klinischen Vorgeschichte, den Ergebnissen anderer Testergebnisse sowie weiteren vorliegenden Informationen zu interpretieren. Es dürfen keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwendet werden. Bei einer automatischen Durchführung (SR300) ist eine Inkubation von 30Min. bei Raumtemperatur ausreichend. Dies sollte jedoch im Einzelfall überprüft werden. Bei Assays, die Antikörper nutzen, besteht die Möglichkeit einer Störung durch in der Patientenprobe enthaltene heterophile Antikörper. Patienten, die regelmäßig mit Tieren in Kontakt kommen oder sich immuntherapeutischen oder -diagnostischen Verfahren unter Einsatz von Immunglobulinen oder Immunglobulin-Fragmenten unterzogen haben, können Antikörper bilden (wie bspw. HAMA), welche die Immunoassays stören. Derartige störende Antikörper können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Die Ergebnisse von Patienten, bei denen das Vorliegen derartiger Antikörper zu vermuten ist, sind sorgfältig zu untersuchen.

Kurzanleitung						
		NSB	Standard	Kontrollen	Proben	Total-Aktivität
Pipettieren	Standard 0	µl	100			
	Standard 1 bis 6	µl		100		
	Kontrollen 1 & 2	µl		100		
	Proben	µl			100	
Pipettieren	Tracer J-125	µl	100	100	100	100
Inkubieren	60 Min bei RT (mind. 300 – 350 upm) schütteln					
Dekantieren	Absaugen bzw. Dekantieren					
Waschen*	Waschlösung	ml	2.0	2.0	2.0	2.0
Dekantieren	Absaugen bzw. Dekantieren insgesamt 2 x Waschen					
Messen	empfohlene Messzeit: 1 Minute					

INTRODUCTION

Thyroid-stimulating hormone (TSH) or human thyrotropin is a glycoprotein hormone of approximate molecular weight of 28,000 Da, secreted by thyrotrope cells of the anterior pituitary gland. hTSH is composed of two non covalently bound distinct subunits designated α and β . The α -subunit is common to the other glycoprotein hormones: follicle stimulating hormone (hFSH), luteinizing hormone (hLH) and

chorionic gonadotropin (hCG). The beta-subunit determines both the biological and immunological specificity and allows the recognition and the differentiation of hTSH from other glycoprotein hormones by the antibody.

The main function of hTSH is the regulation of synthesis and release of the thyroid hormones. The secretion and the liberation of hTSH are stimulated by the hypothalamic tripeptide TRH (TSH-Releasing Hormone) and are controlled by serum concentrations of the thyroid hormones: thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3) through a negative feedback mechanism: in the thyrotrope cells, T4 is desiodinated in T3 which directly inhibits hTSH secretion.

When the hypothalamo-hypophyso-thyroid axis is normal, thyroid hormone insufficiency is associated with a response of the thyrotrope cells to TRH, and an increased secretion of hTSH. In contrast, when thyroid hormones are available in excess, response to TRH is reduced and hTSH secretion is suppressed. Hypothyroidism and hyperthyroidism are associated with pathologies of diverse origins of the hypothalamo-hypophyso-thyroid axis, reflected by the concentrations in hTSH, thyroid hormones, and the hTSH response to the exogenous TRH test: see the following table.

Until now, hTSH measurement was the most sensitive indicator for the diagnosis of primary hypothyroidism with an increased secretion of hTSH and a decrease of thyroid hormone concentrations.

Today, the use of monoclonal antibodies increases the sensitivity of the test by immunoradiometric sandwich assay and allows a better discrimination between hyperthyroid and euthyroid population with a decrease in the level.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The immunoradiometric assay of thyroid-stimulating hormone (TSH) is a "sandwich" type assay. Mouse monoclonal antibodies directed against two different epitopes of TSH and hence not competing are used. The samples or standards are incubated in tubes coated with the first monoclonal antibody in the presence of the second monoclonal antibody labeled with iodine 125. After incubation, the content of tubes is aspirated and the tubes are rinsed so as to remove unbound I-125-labeled antibody. The bound radioactivity is then determined in a gamma counter. The TSH concentrations in the samples are obtained by interpolation from the standard curve. The concentration of TSH in the samples is directly proportional to the radioactivity.

WARNING AND PRECAUTIONS

General remarks:

- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid excessive evaporation.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- A standard curve must be included with each assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Each tube must be used only once.

Basic rules of radiation safety

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material is subject to the regulations of the country of use. Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipeting of radioactive solutions by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and laboratory overalls.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate place, distant from corridors and other busy places.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.

- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide may react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

Materials of human origin

The materials of human origin, contained in this kit, were found negative for the presence of antibodies to HIV 1 and HIV 2, antibodies to HCV, as well as of Hepatitis B surface antigen (HBsAg). However, they should be handled as if capable of transmitting disease. No known test method can offer total assurance that no virus is present. Handle this kit with all necessary precautions.

All serum and plasma samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS and waste should be discarded according to the country rules.

Safety Data Sheet is available at info@demeditec.de

REAGENTS PROVIDED

The TSH Assay contains sufficient reagents for 100 or 300 determinations.

All reagents of the kit are stable until the expiry date indicated on the kit label, if stored at 2-8°C.

After reconstitution / use, the reagents are stable until the expiry date of the kit.

Do not mix reagents from different lots.

Allow reagents to come to room temperature.

SORB | CT Anti-TSH antibody-coated tubes, ready-to-use: 2 (6) x 50 tubes

Anti-TSH | I-125 I-125- anti-TSH Ab-Tracer, ready-to-use:

1 (3) vials each contains 11.0 mL of I-125-labeled immunoglobulins in buffer containing bovine serum albumin. Activity per vial: < 515 kBq, at the date of manufacture, Preservative: sodium azide <0.1% (see § Precautions), and a dye.

CAL TSH-Standards: 0 – 6, ready-to-use:

1 Set with 7 vials each contains 1.0ml bovin serum (see § precautions)

Concentration from 0 to 50 mIU/L. The exact concentration is indicated on the QC datasheet. The standards were calibrated against the international standard, WHO 3rd IS 2003 81/565.

Preservative: sodium azide <0.1% (see § precautions).

CONTROL Controls 1 &2, lyophilised:

2 vials, each contains TSH lyophilised in bovine serum (see § Precautions).

Reconstitute each vial with 1.0 mL distilled water.

The expected values are in the concentration range indicated on the QC datasheet.

It is recommended to store controls after reconstitution at –20°C.

WASH | SOLN | 20x Wash solution, 20xconcentrated:1(3) vials, each contains 50 mL wash-concentrate

Dilute wash-concentrate solution before use up to 1.0L with distilled water.

The diluted washing-solution is stable at 4°C up to the expiry date of the Kit.

Note: Temperatures and expiry dates printed on component vial labels, apply to the long-term storage by manufacturer only, prior to assembling of the kit. Do not take into account.

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

In addition to standard laboratory equipment, the following items are required:

- precision micropipets (100 µL).
- semi-automatic pipets (100 µL & 2.0mL)
- vortex type mixer.
- horizontal or orbital shaker.
- aspiration system. .
- gamma counter set for 125 iodine.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

- Collect blood in tubes containing or not additives.
- Separate serum or plasma from cells by centrifugation.
- Serum and plasma samples may be stored at 2-8°C, if the assay is to be performed within 24 hours. For longer storage keep frozen (at < -18°C) after aliquoting so as to avoid repeated freezing and thawing. If samples have concentrations greater than the highest standard, they must be diluted into the zero standard

ASSAY PROCEDURE**Preparation of reagents**

Let all the reagents come to room temperature.

- Each content of the **control** is reconstituted with the volume of distilled water indicated on the label (1.0 ml). Wait for 30 min following reconstitution and mix gently to avoid foaming before dispensing. Store reconstituted solutions at 2-8°C until the expiry date of the kit or at -20°C for a longer time.
- **Preparation of the wash solution**
Pour the content of the vial into 1.0 L of distilled water and homogenize. The diluted solution may be stored at 2-8°C until the expiry date of the kit.

Procedure:

Allow reagents and samples to warm up at room temperature.

Mix reagents by gentle agitation before use.

- Prepare coated-tubes for: Standards, Controls and Samples and Recoveries in duplicate. Uncoated test-tubes may be used for the Total Activity.
- Pipette 100 µl of each Standard, Control and Sample into the corresponding coated tubes.
- Add 100 µl of I-125-TSH-Ab-Tracer into all tubes, also for the Total-Activity.
- Mix the tubes on vortex and incubate for 60 minutes at room temperature on an orbital shaker (min.300 - 350 rpm).
- Perform an aspiration and washing cycle, with 2 ml of diluted washing solution on all tubes, except those for Total Activity
- Repeat the aspiration and washing cycle, in all twice.
- Aspirate or decant completely the contents or liquid of the tubes
- Count the radioactivity in all tubes for 1 minute by using a gamma-counter.

RESULTS

Results are obtained from the standard curve by interpolation. The curve serves for the determination of TSH concentrations in samples measured at the same time as the standard.

Standard curve

The results in the package insert were calculated using a linear curve fit with B/T (%) or B/B_{max} (%) on vertical axis and the TSH concentration of the standards on the horizontal axis (mIU/L). Other data reduction methods may give slightly different results.

Results of a typical assay.

Do not use the data listed below in place of standard-curve determined at the time of the assay.

Totalaktivität : 193875 cpm				
Standard	mIU/L	Cpm (n=3)	B/ T (%)	B/B _{max} (%)
0	0	48	0,02	0,08
1	0,15	301	0,16	0,50
2	0,50	882	0,46	1,46
3	1,5	2456	1,27	4,06
4	5,0	7799	4,02	12,9
5	15,0	21889	11,3	36,2
6	50,0	60513	31,2	100

Samples

Locate for each sample the B/T (%) or the B/B₀ (%) on the vertical axis and read off the corresponding the TSH concentration of the sample on the horizontal axis in mIU/L.

QUALITY CONTROL

Good laboratory practices imply that control samples be used regularly to ensure the quality of the results obtained. These samples must be processed exactly in the same way as the assay samples, and it is recommended that their results be analysed using appropriate statistical methods.

EXPECTED VALUES

It is recommended, that each laboratory establishes its own normal values. The following values obtained with healthy subjects are indicative only.

Euthyroid : 0.2 - 4.0 mIU/L
Hyperthyroid: ≤ 0.15 mIU/L
Untreated hypothyroid: > 5.0 mIU/L

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

(for more details, see the data sheet "APPENDIX")

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

Sensitivity

Analytical sensitivity: 0.04 mIU/L

Functional sensitivity: 0.141 mIU/L

Specificity

The antibody used in the immunoassay is highly specific for TSH. Extremely low cross reactivities were obtained against several related molecules (LH, FSH, hCG, GH, Prolactin).

Precision

Intra-assay

Samples were assayed in 10 times in the same series. The coefficients of variation were found below or equal to 3.7 % for serum samples.

Inter-assay

Samples were assayed in duplicate in 16 different series. The coefficients of variation were found below or equal to 8.6 % for serum samples.

Accuracy

Dilution test

High-concentration samples were serially diluted with the zero calibrator. The recovery percentages obtained were between 92.7 % and 109 %.

Recovery test

Low-concentration samples were spiked with known quantities of TSH. The recovery percentages obtained were between 99.4 % and 107 %.

Measurement range (from analytical sensitivity to highest calibrator):

0.04 to approximately 50 mIU/L.

LIMITATIONS

The non-respect of the instructions in this package insert may affect results significantly. Results should be interpreted in the light of the total clinical presentation of the patient, including clinical history, data from additional tests and other appropriate information. Do not use hemolyzed, lipemic or icteric samples. Shortage of incubation time to 30 minutes was tested on SR300 instrument. Performance characteristics of the assay are not guaranteed if different automate is used. For assays employing antibodies, the possibility exists for interference by heterophile antibodies in the patient sample. Patients who have been regularly exposed to animals or have received immunotherapy or diagnostic procedures utilizing immunoglobulins or immunoglobulin fragments may produce antibodies, e.g. HAMA, that interfere with immunoassays. Such interfering antibodies may cause erroneous results. Carefully evaluate the results of patients suspected of having these antibodies.

Short instruction						
		NSB	Standard	Controls	Proben	Total-activity
Pipette:	Standard 0	µl	100			
	Standard 1 - 6	µl		100		
	Controls 1 & 2	µl		100		
	Samples	µl			100	
Pipette:	Tracer I-125	µl	100	100	100	100
Incubate:	60 Min at RT (min. 300 – 350 rpm) shaking					
Decant:	Aspirate or Decant					
Wash:	Wash-Solution	ml	2.0	2.0	2.0	2.0
Decant:	Aspirate or decant					
	Wash tubes twice with 2.0mL					
Measure:	Recommended measuring time: 1 Minute					

APPENDIX**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

Specificity

Data on cross-reactivity with several hormones are presented in the following table: Cross-reactivity (%) = TSH concentration (for $B/B_{max} = 0.5$) \times 100/ Hormone concentration (for $B/B_{max} = 0.5$)

Hormon	Cross-reactivity (%)
TS	10
H	0
LH	N
FS	D
H	N

ND = Non-Detectable (<0.1 %)

Precision**Intra-assay**

Serum samples	S1	S2	S3	S4
Number of determinations	10	10	10	10
Mean value (mIU/L)	2.02	5.83	10.0	42.0
CV (%)	3.0	2.5	3.2	3.7

EDTA plasma samples	P1	P2	P3
Number of determinations	25	25	25
Mean value (mIU/L)	1.15	8.30	31.32
CV (%)	3.47	1.88	2.77

Inter-assay

Serum samples	S1	S2	S3
Number of determinations	16	16	16
Mean value (mIU/L)	3.10	9.7	39.6
CV (%)	8.6	5.7	2.8

EDTA plasma samples	P1	P2	P3
Number of determinations	10	10	10
Mean value (mIU/L)	1.52	18.5	33.4
CV (%)	3.36	4.36	1.76

Accuracy**Dilution test**

Serum samples were diluted in zero calibrator and assayed according to the assay procedure of the kit.

Serum	Dilution factor	TSH (mIU/L)		Ratio (%) Measured/ Expected
		Measured	Expected	
S1	undil.	47.9	-	-
	1/2	22.4	23.95	93.5
	1/4	11.1	11.98	92.7
	1/8	5.8	5.99	96.9
	1/16	3.0	3.0	100.0
S2	undil.	18.3	-	-
	1/2	9.3	9.15	101.6
	1/4	4.6	4.58	100.5
	1/8	2.5	2.29	109.3
	1/16	1.2	1.14	105.0
S3	undil.	49.7	-	-
	1/2	24.5	24.85	98.6
	1/4	12.5	12.43	100.6
	1/8	6.1	6.21	98.2
	1/16	3.2	3.11	103.0

Plasma samples were diluted in the zero calibrator and assayed according to the procedure of the kit.

EDTA -plasma	Dilution factor	TSH (mIU/L)		Ratio (%) Measured/ Expected
		Measured	Expected	
P1	undil.	6.23	-	-
	1/2	3.10	3.12	99.52
	1/4	1.63	1.56	104.7
	1/8	0.75	0.78	96.31
	1/16	0.40	0.39	102.7
	1/32	0.22	0.19	113.0
P2	undil.	7.81	-	-
	1/2	3.99	3.91	102.2
	1/4	1.93	1.95	98.85
	1/8	0.98	0.98	100.4
	1/16	0.49	0.49	100.4
	1/32	0.24	0.24	98.34
P3	undil.	7.53	-	-
	1/2	3.78	3.77	100.4
	1/4	1.85	1.88	98.27
	1/8	1.00	0.94	106.2
	1/16	0.45	0.47	95.62
	1/32	0.22	0.24	93.49
P4	undil.	8.86	-	-
	1/2	4.48	4.43	101.1
	1/4	2.22	2.22	100.2
	1/8	1.13	1.11	102.0
	1/16	0.56	0.55	101.1
	1/32	0.32	0.28	115.6
P5	undil.	6.77	-	-
	1/2	3.32	3.39	98.08
	1/4	1.62	1.69	95.72
	1/8	0.83	0.85	98.08
	1/16	0.43	0.42	101.6
	1/32	0.24	0.21	113.4

Recovery**test**

TSH was added to 5 serum samples and assayed according to the procedure of the kit.

Serum	Dilution factor	TSH (mIU/L)		Ratio (%) Measured/ Expected
		Measured	Expected	
S1	undil.	47.9	-	-
	1/2	22.4	23.95	93.5
	1/4	11.1	11.98	92.7
	1/8	5.8	5.99	96.9
	1/16	3.0	3.0	100.0
S2	undil.	18.3	-	-
	1/2	9.3	9.15	101.6
	1/4	4.6	4.58	100.5
	1/8	2.5	2.29	109.3
	1/16	1.2	1.14	105.0
S3	undil.	49.7	-	-
	1/2	24.5	24.85	98.6
	1/4	12.5	12.43	100.6
	1/8	6.1	6.21	98.2
	1/16	3.2	3.11	103.0

TSH was added to 5 EDTA-plasma samples and assayed according to the procedure of the kit.

EDTA plasma	Endogen. conc. (mIU/L)	Added conc. (mIU/L)	Expected conc. (mIU/L)	Measured conc. (mIU/L)	Ratio (%) Measured/ Expected
P1	3.43	1.22	4.65	4.60	98.85
	3.35	2.38	5.73	5.63	98.20
	3.20	4.55	7.75	7.43	95.93
P2	3.07	1.22	4.29	4.33	100.9
	3.00	2.38	5.38	5.57	103.5
	2.86	4.55	7.41	7.42	100.2
P3	1.70	1.22	2.92	2.87	98.39
	1.66	2.38	4.04	4.09	101.3
	1.58	4.55	6.13	6.03	98.41
P4	4.75	1.22	5.97	5.94	99.49
	4.64	2.38	7.02	7.21	102.7
	4.43	4.55	8.97	9.11	101.5
P5	1.25	1.22	2.47	2.55	103.3
	1.22	2.38	3.60	3.62	100.6
	1.16	4.55	5.71	6.01	105.3

125I Characteristics







T_{1/2} (125I) = 1443 h = 60.14 d

125I	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25

BIBLIOGRAPHY

- BURGER H. G. & PATEL Y. C. (1972); The value of serum thyrotropin measurement in the diagnosis and management of hypothyroidism: *Med. J. Aust.* 2 293
- HALL R., ORMSTON B. J., BESER G. M., CRYER R. J. & Mc KENDRICK M. (1972); The Thyrotropin-releasing hormone test in diseases of the pituitary and hypothalamus: *The Lancet* 1, 7, 754
- PIERCE J. G. & PARSONS T. F. (1981); Glycoprotein hormones: structure and function: *Ann. Rev. Biochem.* 50, 465
- MUSTO J.D., PIZZOLANTE J.M., CHESARONE V.P. (1984); A comment on thyrotropin measurement and evaluation, *Clin.Chem.*, 30, 329
- SOOS M., TAYLOR S.I., GARD T.; SIDDLE K. (1984); A rapid , sensitive two-site immunometric assay for TSH using monoclonal antibodies. Investigations of factors affecting optimisation; *J. Immunol. Methods*, 98, 173
- BENKIRANE M., BON D.; BELLOT F. ; PRINCÉ P.; HASSOUN J.; CARAYON P. ; DELORI P. (1987) ; Characterisation of monoclonal antibodies against human thyrotropin and use in an immunoradiometric assay and immunohistochemistry, *J. Immunol.Methods*, 98, 173
- BENKIRANE M.; BON D., PAOLUCCI F. ; DARBOURET B.; PRINCÉ P.; CARAYON P. (1987) ; Monoclonal antibody mapping of human thyrotropin and its subunits, *Endocrinology* 121, 1171
- BENKIRANE M.; BON D., CORDEIL M. ; DELORI P. ; DELAAGE M.A. (1987) ; Immunization with immune complexes : Characterization of monoclonal antibodies against a TSH antibody complex, *Molecular Immunology* 24, 1309

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konfirmitätskennzeichnung	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 Diagnostic in vitro	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
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	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