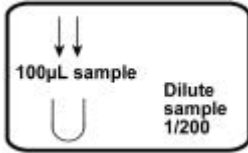
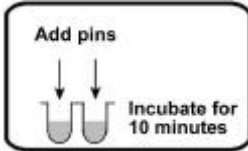


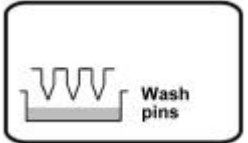
1.



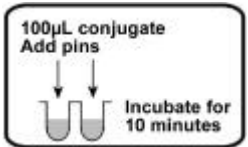
2.



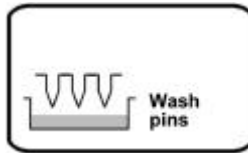
3.



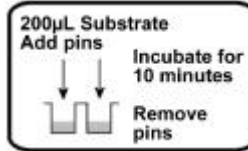
4.



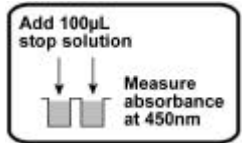
5.



6.



7.



A5341.4
March '04

MELISA™ TAB

Micropin enzyme-linked immunosorbent assay for thyroid antibodies

Combined Anti-Tg/TPO

Combined anti-thyroglobulin antibodies and anti-thyroid peroxidase antibodies assay kit

Code: M2496

Anti-Tg

Anti-thyroglobulin antibodies assay kit

Code: M2196

Anti-TPO

Anti-thyroid peroxidase antibodies assay kit

Code: M2396

Instructions for Use

Gebrauchsinformation

English: pages 1 to 13

Deutsch: Seite 14 bis 30

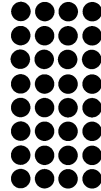
Cambridge Life Sciences
Cambridgeshire Business Park, Angel Drove

Ely, Cambs. CB7 4DT UK

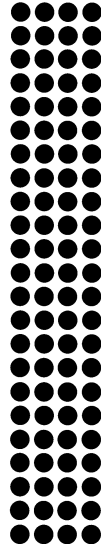
Tel: 01353 645200 Fax: 01353 645250

e-mail: clssales@byk.co.uk

www.cambridgelifesciences.co.uk



CAMBRIDGE
LIFE
SCIENCES



1. Intended Use

The Combined Anti-Tg/TPO, Anti-Tg and Anti-TPO MELISA™ TAB products are sandwich enzyme immunoassays for the quantitative detection of antibodies to thyroglobulin (anti-Tg) and to thyroid peroxidase (anti-TPO) in human serum.

The anti-Tg standards are calibrated against the WHO 1st Reference Preparation (1971) MRC 65/93.

The anti-TPO standards are calibrated against the reference preparation NIBSC 66/387.

2. Background

Autoimmune thyroid gland disorders are characterised by the detection of anti-thyroid antibodies against Tg and TPO antigens. TPO has been identified as the specific antigenic determinant of the thyroid microsomal antigen.

The presence of auto-antibodies to thyroid antigens correlates with the degree of lymphocytic infiltration of the thyroid gland, the hallmark of Hashimoto's thyroiditis. Circulating auto-antibodies to Tg and TPO are present in the serum of over 90% of patients with thyroid autoimmune diseases such as Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, idiopathic hypothyroidism and sub-acute thyroiditis. In each case, the prevalence of anti-TPO antibodies is greater than that of anti-Tg antibodies.

It is reported that low levels of autoimmune antibodies predict at-risk pregnancy. Furthermore, a report using an EIA test for anti-thyroglobulin and anti-recombinant TPO demonstrated a 100% increase in the rate of spontaneous miscarriage in women who had detectable serum thyroid auto-antibodies in their first trimester of pregnancy.

Thyroid auto-antibodies are detected using immunoassays such as passive haemagglutination, indirect fluorescence antibody (IFA), enzyme immunoassay (EIA) and radioimmunoassay (RIA) techniques. MELISA™ TAB Anti-Tg uses human thyroglobulin. MELISA™ TAB Anti-TPO uses recombinant human thyroid peroxidase which does not contain contaminating thyroglobulin and/or mitochondria found in other microsomal antigen preparations. Both of these assays are in an EIA test format.

3. Principle

MELISA™ TAB products employ a unique antigen-coated micropin technology, which is ideal for the batch-screening of large numbers of samples for anti-thyroid antibodies. The methods utilise a non-competitive sandwich enzyme immunoassay system.

First Incubation

MELISA™ TAB micropins are provided coated with purified antigen (human thyroglobulin and recombinant thyroid peroxidase respectively). When the micropins are immersed into wells containing standards, controls or diluted sera, any anti-Tg or anti-TPO antibodies present will bind to the micropin surface. The micropins are then removed and washed in wash buffer.

15. Literatur

1. Salvi, M. *et al* (1988) Role of auto-antibodies in the pathogenesis and association of endocrine autoimmune disorders; *Endocrine Reviews* **9** (4): 450-465
2. Volpe, R. (1977) The role of autoimmunity in hypoendocrine and hyperendocrine function. *Ann Int Med* **87**: 86-99
3. Yoshida, H. *et al* (1978) Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: studies of seventy autopsied cases. *J Clin Endo Metab* **46** (6): 859-862
4. Cowchock, S. *et al* (1984) Subclinical autoimmune disease and unexplained abortion. *Am. J Obstet Gynecol* **150**: 367-371
5. Maier, D.B. *et al* (1989) Subclinical autoimmunity in recurrent aborters. *Fertil Steril* **51** (2): 280-285
6. Stagnaro-Green, A. *et al* (1990) Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid auto-antibodies. *JAMA* **264** (11): 1422-1425
7. Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (1984)
8. Hijmans, W. *et al* (1961) Serological overlap between lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and thyroid auto-immune disease. *Brit Med J* **2**: 909-914
9. Roman, S.H. *et al* (1986) Thyroid auto-antibodies in HLA-genotyped type I diabetic families: sex-limited DR5 association with thyroid microsomal antibody. *Clin Endocrin* **25**: 23-33
10. Beever, K. *et al* (1989) Highly sensitive assays of auto-antibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase *Clin Chem* **35** (9): 1949-1954
11. Stites, D.P. *et al* (1994) Basic and clinical immunology. 8th edition. Appleton & Lange.

Second Incubation

The micropins are then dipped into wells containing anti-IgG-horseradish peroxidase (HRP) conjugate, which will bind to any captured antibodies. Unbound conjugate is removed by washing in wash buffer.

Third Incubation

The micropins are then dipped into wells containing a colourless substrate. The reaction is stopped with the supplied stop solution. The intensity of the yellow colour formed is proportional to the concentration of anti-thyroid antibody bound in the first incubation.

4. Kit Contents

5 standards* (1.0mL ready to use)

Standard	Anti-Tg IU/mL	Anti-TPO IU/mL
1	0	0
2	300	100
3	750	250
4	3000	1000
5	7500	2500

(*For Combined Anti-Tg/TPO MELISA™ TAB, product code:M2496, 2 x 5 standards are included i.e. 1 set Anti-Tg and 1 set Anti-TPO).

- 1 vial wash buffer concentrate (x25), 20mL
- 1 vial sample diluent, 100mL
- 1 vial conjugate (anti-IgG-HRP), 12mL
- 1 vial substrate (TMB*), 21mL
- 1 vial stop solution (oxalic acid), 12mL
- 1 foil sachet containing 1 set of 96 antigen-coated micropins and 1 flat-well plate
- 1 vial Positive control (1.0mL ready to use)
- 1 vial Negative control (1.0mL ready to use)
- 2 round-well plates
- 2 wash trays
- 1 instruction leaflet
- 1 QC certificate

* TMB = 3,3', 5,5'-tetramethyl benzidine.

5. Storage

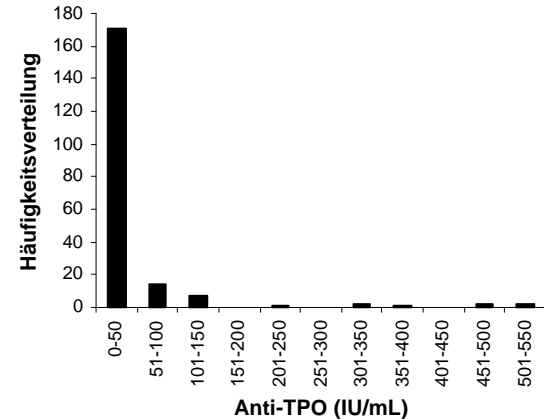
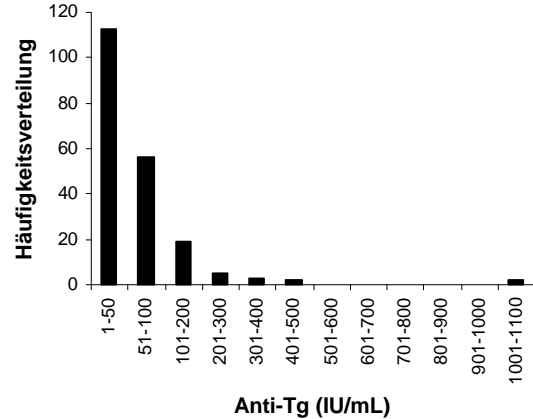
The kit should be stored at 2-8°C. Do not use the reagents beyond their expiry date. Do not freeze. Keep all reagents away from direct sunlight.

6. Safety Precautions

For *in-vitro* diagnostic use only.

For Professional use only.

The standards and controls contain human source material. Although found negative when tested for HIV-1 and HIV-2 antibodies, HCV and hepatitis B surface antigen, no test can guarantee their absence. Therefore, the standards and controls should be handled using the same safety precautions employed when handling any potentially infectious material.



Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze, definiert als der Wert, der 2 Standardabweichungen über dem Mittelwert des Probediluenten liegt, beträgt für

Anti-Tg: 17,5 IU/mL
Anti-TPO: 1,8 IU/mL

Referenzbereiche

Die Anti-Tg- und Anti-TPO-Konzentrationen von 100 gesunden, asymptomatischen Blutspendern wurden mit Hilfe des MELISA™ TAB Tests in Doppelbestimmung untersucht. Dabei wurden folgende Referenzbereiche ermittelt:

	Anti-Tg (IU/mL)	Anti-TPO (IU/mL)
Normalbereich	<164,3	<72,5
grenzwertig	164,3 - 217,6	72,5 - 97,6
positiv	>217,6	>97,6

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich erstellt.

Used standards, samples and controls, pipette tips and plates should be handled as clinical waste and incinerated or disposed of in accordance with local rules. Other reagents should be diluted and flushed down the drain. It is recommended that gloves are worn when handling such items.

Safety data sheets are available on request.

7. Sample Handling

The assay may be performed on human serum samples. Samples should be assayed within 24 hours of collection or stored frozen at -15°C or colder. Repeated freeze-thawing is not advisable. Do not heat treat samples.

8. Additional Reagents and Equipment

Deionised water.
Precision micropipettes and disposable tips to deliver 5 - 1000µL.
Multichannel micropipette or repeating dispenser to deliver 100 and 200µL.
500mL measuring cylinder for reagent preparation.
96-well microplate reader with 450nm filter.
Software package (optional).

9. Procedural Precautions

Carefully read instructions for use before starting with the assay.

Allow all reagents to equilibrate to room temperature (18-25°C) before use for a minimum of two hours.

Avoid the use of icteric, lipaemic or grossly haemolysed samples.

Always change pipette tips between different standards, samples or controls to prevent sample carryover.

Never allow the same pipette tip to be used with different reagents. Special care is needed to prevent contamination of the substrate by the conjugate.

The substrate should be colourless. Any coloration indicates substrate contamination and the substrate should be discarded.

The micropin washing procedure is critical for the successful performance of the test, especially between conjugate and substrate incubations (i.e. the second and third incubations). Do not use the kit beyond the expiry date given on the box.

Reagents must not be re-used.

14. Testcharakteristika

Präzision

Anti-Tg:

<i>Intra-assay Präzision</i> (n=20)	Mittelwert (IU/mL)	VK (%)
Probe 1	101,0	6,0
Probe 2	669,5	6,1

Anti-Tg:

<i>Inter-assay Präzision</i> (n=10)	Mittelwert (IU/mL)	VK (%)
Probe 1	113,3	8,6
Probe 2	667,4	11,9

Anti-TPO:

<i>Intra-assay Präzision</i> (n=20)	Mittelwert (IU/mL)	VK (%)
Probe 1	32,0	8,0
Probe 2	239,9	9,0

Anti-TPO:

<i>Inter-assay Präzision</i> (n=10)	Mittelwert (IU/mL)	VK (%)
Probe 1	38,7	8,6
Probe 2	225,8	6,5

12. Auswertung

Für jeden Testlauf ist eine Standardkurve zu erstellen, indem die mittlere Extinktion der Proben gegen die Standardkonzentration auf Millimeterpapier aufgetragen wird; dabei sind unbekannte Werte zu interpolieren.

Alternativ kann auch ein computergesteuertes Kurvenanpassungsprogramm verwendet werden. Proben, deren Werte oberhalb des Standardbereichs liegen, sind weiter zu verdünnen und erneut zu testen.

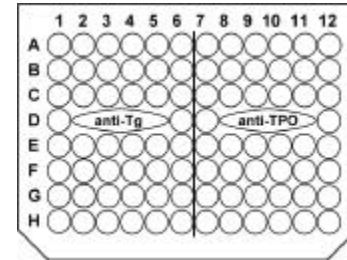
13. Qualitätskontrolle

Bei vielen Parametern ist die regelmässige Teilnahme an Ringversuchen für die externe Qualitätskontrolle vorgeschrieben. Für die laborinterne Qualitätskontrolle sind die im Kit enthaltene Kontrollen gut geeignet. Sie sollten bei jedem Ansatz mitgeführt und wie jede Patientenprobe behandelt werden.

Vergleichen Sie Ihre Messergebnisse mit jenen im Qualitätskontrollbericht; dort sind die Sollwerte der Kontrollserien mit den entsprechenden Toleranzen angegeben. Liegt eine der Kontrollen ausserhalb des angegebenen Bereichs, sind die Ergebnisse ungültig. In diesem Falle ist der Testansatz zu wiederholen.

10. Assay Procedure

For Combined Anti-Tg/TPO MELISA™ TAB plate layout, see diagram below. Product Code: M2496.



In the Combined Anti-Tg/TPO assay kit, anti-Tg is measured on the left hand side of the plate and the anti-TPO on the right hand side.

1. Prepare the wash buffer as follows: dilute contents of the **wash buffer concentrate** (x25) vial to 500mL with deionised water.
2. Dilute patient samples 1/200 using the **sample diluent** e.g. 5µL sample added to 995µL diluent. The **standards** and **controls** do not require dilution.
3. Prepare the sample plate by dispensing 100µL of each **standard**, diluted patient sample or **controls** into appropriate wells of a round-well plate. It is recommended that samples be tested in duplicate.
4. Prepare for the micropipette washing stage by pouring wash buffer into each of the two wash trays, so that it fills the central reservoir.

5. Remove the **antigen-coated micropins** from the foil sachet. Transfer the micropins to the sample plate and incubate for 10 minutes at room temperature (18-25°C). During the incubation period, prepare the conjugate plate by dispensing 100µL **conjugate** into each well of the second round-well plate.
6. After incubation, transfer the micropins to the first wash tray and gently agitate by sideways and up and down movements for at least 10 seconds. Flick off the excess wash buffer or gently drain on absorbent paper. Repeat in the second wash tray, afterwards ensuring that the micropins are free of wash buffer and bubbles.
7. Transfer the micropins to the conjugate plate and incubate for 10 minutes at room temperature (18-25°C). During the incubation period, prepare the substrate plate by dispensing 200µL of **substrate** into each well of the flat-well plate. Also, prepare for the final micropin washing stage by replenishing the wash trays with wash buffer so that it fills the central reservoir.
8. After incubation, wash the micropins as in step 6.
9. Transfer the micropins to the substrate plate and incubate for 10 minutes at room temperature (18-25°C).
10. After incubation, carefully remove the micropins from the plate and discard them. Add 100µL of **stop solution** to each well. The developed colour will change from blue to yellow.
11. Measure the absorbance at 450nm on a 96-well microtitre plate reader.

Fließschema

100 ìL	unverdünnte Standard vorverdünnte (1:200) Patientenprobe und Kontrolle in alle Vertiefungen pipettieren
Inkubieren	10 min bei RT (18-25°C)
100 ìL	Konjugat in alle Vertiefung der 2. Rundbodenplatte pipettieren
Waschen	mit Waschpuffer
Inkubieren	10 min bei RT (18-25°C)
200 ìL	Substrat in alle Vertiefungen der Flachbodenplatte pipettieren
Waschen	mit Waschpuffer
Inkubieren	10 min bei RT (18-25°C)
100 ìL	Stopplösung in alle Vertiefungen pipettieren
Messen	Mikrotiterplattenreader: bei 450 nm

6. Die Micropins in die Konjugat-Platte überführen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Während der Inkubation wird die Substrat-Platte vorbereitet, indem 200 µL **Substrat** in jede Vertiefung der Flachbodenplatte pipettiert wird. Ausserdem wird der letzte Micropin-Waschvorgang vorbereitet, indem soviel Waschpuffer in die Waschschalen gefüllt wird, bis das Reservoir in der Mitte wieder aufgefüllt ist.
7. Nach der Inkubation werden die Micropins erneut gewaschen (siehe Schritt 5).
8. Die Micropins in die Substrat-Platte überführen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren (18-25°C).
9. Nach der Inkubation werden die Micropins vorsichtig aus der Platte herausgenommen und entsorgt. Zum Abstoppen der Reaktion werden 100 µL **Stopplösung** in alle Vertiefungen pipettiert.
10. Extinktion bei 450 nm ablesen (Mikrotiterplattenreader).

11. Calculation of Results

For each assay, prepare a calibration curve by plotting mean absorbance against standard concentration on linear graph paper, and interpolate unknowns. Alternatively, use a computerised curve-fit program. Any sample giving values above the standard range should be further diluted and re-tested.

12. Quality Control

Good laboratory practice requires that quality control samples be included in every run to check on assay performance. High and low controls for anti-Tg and anti-TPO antibodies are provided within the kits. These controls are ready-to-use and do not require dilution. If either control value falls outside the quoted range on the QC Certificate, the results are invalid and the assay should be repeated.

13. Performance Characteristics

1. Precision data

Anti-Tg:

<i>Intra-assay</i> (n=20)	Mean (IU/mL)	CV (%)
------------------------------	-----------------	-----------

Sample 1	101.0	6.0
----------	-------	-----

Sample 2	669.5	6.1
----------	-------	-----

Anti-Tg:

<i>Inter-assay</i> (n=10)	Mean (IU/mL)	CV (%)
------------------------------	-----------------	-----------

Sample 1	113.3	8.6
----------	-------	-----

Sample 2	667.4	11.9
----------	-------	------

Anti-TPO:

<i>Intra-assay</i> (n=20)	Mean (IU/mL)	CV (%)
------------------------------	-----------------	-----------

Sample 1	32.0	8.0
----------	------	-----

Sample 2	239.9	9.0
----------	-------	-----

Anti-TPO:

<i>Inter-assay</i> (n=10)	Mean (IU/mL)	CV (%)
------------------------------	-----------------	-----------

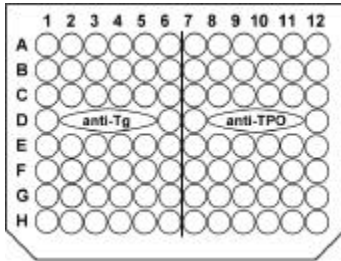
Sample 1	38.7	8.6
----------	------	-----

Sample 2	225.8	6.5
----------	-------	-----

1. Waschpuffer herstellen (siehe **Vorbereitung der Reagenzien**).
2. Patientenproben verdünnen. Alle Proben werden in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt, (z.B. 5 µL Probe in 995 µL Probendiluent).
Bitte beachten: Standards und Kontrollen nicht mit Probendiluent vorverdünnen!
3. Je 100 µL Standard, vorverdünnte Patientenprobe und Kontrolle in die entsprechenden Vertiefungen der Rundbodenplatte pipettieren.
4. Die **antigenbeschichteten Micropins** dem Folienbeutel entnehmen. Micropins in die Proben-Platte überführen und 10 Minuten bei Raumtemperatur (18-25°C) inkubieren. Während der Inkubation wird die Konjugat-Platte vorbereitet, indem 100 µL **Konjugat** in jede Vertiefung der Rundbodenplatten pipettiert wird.
5. Nach der Inkubation werden die Micropins in die erste Waschschale überführt und mind. 10 Sekunden lang vorsichtig bewegt (leicht seitwärts sowie auf und ab schwenken). Überschüssigen Waschpuffer abschütten oder vorsichtig mit saugfähigem Papier trocknen. Mit der zweiten Waschschale ebenso verfahren. Am Ende des Vorgangs darf weder Waschpuffer an den Micropins haften noch dürfen sich Blasen gebildet haben.

11. Testablauf

Das nachstehende Diagramm zeigt die Aufteilung der Mikrotiterplatte des MELISA™ TAB Anti-Tg/TPO Kombikits (Code: M2496):



Beim Anti-Tg/TPO Kombikit wird Anti-Tg auf der linken Seite der Platte und Anti-TPO auf der rechten Seite gemessen.

Die Doppelbestimmung von Standards, Kontrollen und Proben wird empfohlen. Alle Reagenzien vor Testbeginn auf Raumtemperatur bringen (18-25°C).

2. Minimum detectable concentration

The minimum detectable concentration, defined as the concentration equal to 2 standard deviations from the mean of the sample diluent, was found to be:

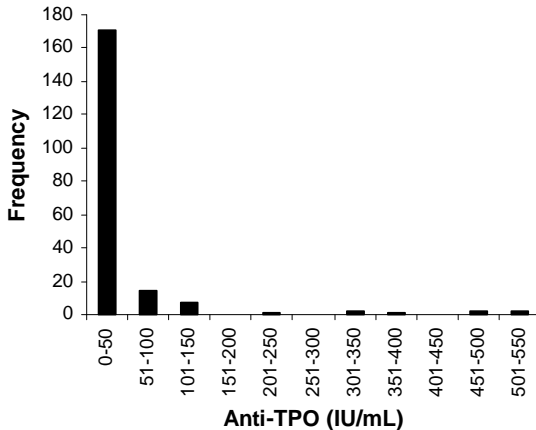
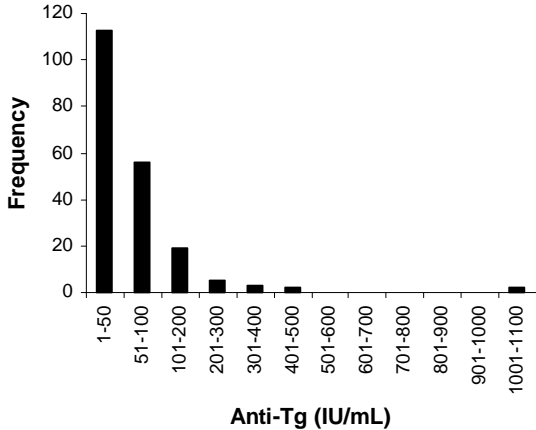
17.5 IU/mL (anti-Tg)
1.8 IU/mL (anti-TPO)

3. Reference Ranges

MELISA™ TAB was used to determine the anti-Tg/TPO levels of 100 serum samples measured in duplicate from normal blood donors with no apparent abnormalities. The data was evaluated and the following ranges obtained:

	Anti-Tg (IU/mL)	Anti-TPO (IU/mL)
Normal range	<164.3	<72.5
Borderline	164.3 - 217.6	72.5 - 97.6
Positive	>217.6	>97.6

It is advised that each laboratory establishes its own reference range.



- Niemals dieselbe Pipettenspitze für verschiedene Reagenzien verwenden. Insbesondere ist darauf zu achten, dass das Substrat nicht durch das Konjugat kontaminiert wird.
- Das Substrat sollte farblos sein. Eine Verfärbung weist auf die Kontamination des Substrats hin; in diesem Falle ist das Substrat zu verwerfen.
- Das sachgemäße Waschen der Micropins ist für die erfolgreiche Durchführung des Tests von entscheidender Bedeutung. Dies gilt insbesondere für den Waschschrift zwischen der Inkubation des Konjugats und des Substrats (2. und 3. Inkubation). Das Testbesteck darf nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- Die Reagenzien dürfen nicht wiederverwendet werden.
- Mikrobielle Kontamination der Reagenzien vermeiden.
- Die Richtlinien zur Durchführung der Qualitätskontrolle in medizinischen Laboratorien beachten.

10. Vorbereitung der Reagenzien

Herstellung des Waschpuffers

Inhalt der Flasche mit dem Waschpufferkonzentrat (25-fach) mit dest. Wasser auf 500 mL verdünnen.

Die **Standards** und **Kontrollen** liegen gebrauchsfertig vor.

Vorbereitung des Waschens der Micropins

Soviel Waschpuffer in beide Waschschaalen geben, bis beide Reservoirs in der Mitte der Platte voll sind.

8. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

- Deionisiertes oder destilliertes Wasser (im weiteren Text als dest. Wasser bezeichnet)
- Präzisionsmikropipetten mit austauschbaren Plastikspitzen (5 - 1000 µL)
- Multikanal-Mikropipette oder Repetier-Dispenser (100 bzw. 200 µL)
- Messzylinder für die Vorbereitung der Reagenzien (500mL)
- Mikrotiterplattenreader mit 450 nm-Filter
Optional:
- Software-Paket

9. Durchführungshinweise

- Die einzelnen Komponenten des Kits sind optimal aufeinander abgestimmt. Beim Austausch oder Mischen von Komponenten verschiedener Chargen gewährleistet der Hersteller die Zuverlässigkeit der Ergebnisse nicht mehr. Die Chargen-Nummern der Originalkomponenten sind auf der Unterseite der Kitpackung aufgelistet.
- Komponenten aus Testbestecken verschiedener Chargen nicht austauschen.
- Angegebene Reihenfolge der Pipettierschritte unbedingt beachten.
- Für jedes Pipettieren von Standards, Patientenproben und Kontrollen sind stets neue Pipettenspitzen zu verwenden, um ein "Verschleppen" von Probenmaterial zu vermeiden.

14. Bibliography

1. Salvi, M. *et al* (1988) Role of auto-antibodies in the pathogenesis and association of endocrine autoimmune disorders; *Endocrine Reviews* **9** (4): 450-465
2. Volpe, R. (1977) The role of autoimmunity in hypoendocrine and hyperendocrine function. *Ann Int Med* **87**: 86-99
3. Yoshida, H. *et al* (1978) Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: studies of seventy autopsied cases. *J Clin Endo Metab* **46** (6): 859-862
4. Cowchock, S. *et al* (1984) Subclinical autoimmune disease and unexplained abortion. *Am. J Obstet Gynecol* **150**: 367-371
5. Maier, D.B. *et al* (1989) Subclinical autoimmunity in recurrent aborters. *Fertil Steril* **51** (2): 280-285
6. Stagnaro-Green, A. *et al* (1990) Detection of at-risk pregnancy by means of highly sensitive assays for thyroid auto-antibodies. *JAMA* **264** (11): 1422-1425
7. Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual: Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (1984)
8. Hijmans, W. *et al* (1961) Serological overlap between lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and thyroid auto-immune disease. *Brit Med J* **2**: 909-914
9. Roman, S.H. *et al* (1986) Thyroid auto-antibodies in HLA-genotyped type I diabetic families: sex-limited DR5 association with thyroid microsomal antibody. *Clin Endocrin* **25**: 23-33
10. Beever, K. *et al* (1989) Highly sensitive assays of auto-antibodies to thyroglobulin and to thyroid peroxidase *Clin Chem* **35** (9): 1949-1954
11. Stites, D.P. *et al* (1994) Basic and clinical immunology. 8th edition. Appleton & Lange.

1. Anwendung

Der MELISA™ TAB Anti-Tg/TPO-Kombikit sowie die MELISA™ TAB Anti-Tg und Anti-TPO Einzelkits sind Enzymimmunoassays ("Sandwich"-Prinzip) zur quantitativen Bestimmung von Autoantikörpern gegen Thyroglobulin (Tg) und Thyreoidale Peroxidase (TPO) in Humanserum.

Die Anti-Tg-Standards sind gegen den WHO-Standard 1. IRP (1971) MRC 65/93 kalibriert.

Die Anti-TPO-Standards sind gegen die Referenzpräparation NIBSC 66/387 kalibriert.

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Tests

Bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse sind Antikörper gegen körpereigenes Schilddrüsengewebe nachweisbar, vor allem gegen Thyroglobulin (Tg) und Thyreoidale Peroxidase (TPO). Dabei wurde TPO als spezifische Antigendeterminante des thyreoidalen mikrosomalen Antigens identifiziert.

Das Auftreten von Autoantikörpern gegen Schilddrüsenantigene korreliert mit dem Grad der lymphoiden Infiltration der Schilddrüse, dem Hauptsymptom der Autoimmunthyreoiditis (Hashimoto-Thyreoiditis). Zirkulierende Autoantikörper gegen Tg und TPO sind im Serum von über 90% der Patienten mit Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (Hashimoto-Thyreoiditis, Morbus Basedow, idiopathische Hypothyreose und subakute Thyreoiditis) nachweisbar, wobei Anti-TPO-Antikörper häufiger vorkommen als Anti-Tg-Antikörper.

- Das Substrat enthält das Konservierungsmittel TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin); Berührung mit Haut oder Schleimhäuten vermeiden. Für den Fall, dass es doch zu einem Kontakt mit Haut oder Schleimhäuten kommt, wird sorgfältiges und gründliches Waschen mit Wasser empfohlen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Während des Umgangs mit Proben oder Reagenzien des Testbestecks darf nicht geraucht, gegessen oder getrunken werden. Beim Umgang mit Proben oder Kit-Reagenzien Handschuhe tragen und anschliessend Hände sorgfältig waschen. Verspritzen oder Aerosolbildung vermeiden. Verschüttetes Material umgehend und sorgfältig aufwischen und kontaminierte Gegenstände vorschriftsmässig entsorgen bzw. dekontaminieren.
- Sicherheits-Datenblätter sind auf Anforderung erhältlich.

7. Gewinnung und Lagerung der Proben

- Die MELISA™ TAB Tests werden mit Humanserumproben durchgeführt.
- Ikterische, lipämische oder stark hämolytische Seren sollten nicht verwendet werden.
- Die Proben sollten innerhalb von 24 Stunden nach der Abnahme verarbeitet werden.
- Für längere Aufbewahrung sollten sie bei mindestens -15°C eingefroren werden.
- Wiederholtes Einfrieren und Auftauen vermeiden.
- Die Proben dürfen nicht erhitzt werden.

5. Lagerung der Reagenzien

- Das Testbesteck ist bei 2-8°C zu lagern.
- Die Reagenzien dürfen nach dem angegebenen Verfallsdatum nicht mehr verwendet werden.
- Die Reagenzien nicht einfrieren.
- Die Reagenzien dürfen nicht dem direkten Sonnenlicht ausgesetzt werden.

6. Vorsichtsmassnahmen

Dieses Testbesteck darf nur für die *in vitro* Diagnostik verwendet werden.

Nur Gebrauch durch Fachpersonal

- Alle für die Herstellung der Standards und Kontrollen verwendeten humanen Serumbestandteile wurden mit Hilfe von Immunoassays auf Hepatitis-B-Oberflächenantigen und Antikörper gegen HIV1, HIV2 sowie HCV überprüft und als nicht reaktiv befunden. Keine derzeit bekannte Testmethode kann jedoch die Möglichkeit ausschliessen, dass mit Humanmaterialien Infektionen übertragen werden können. Daher sind diese Materialien, wie auch die Patientenproben, als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu handhaben.

Es wird berichtet, dass niedrige Autoantikörperkonzentrationen auf eine Risikoschwangerschaft hinweisen. Darüber hinaus liegt eine Studie vor, nach der mittels eines EIA-Tests auf Antithyroglobulin und rekombinantes Anti-TPO ein hundertprozentiger Anstieg der Rate spontaner Aborte bei Frauen nachgewiesen wurde, die im ersten Trimenon der Schwangerschaft messbare Konzentrationen von Schilddrüsenautoantikörpern im Serum aufwiesen.

Schilddrüsenautoantikörper sind mit immunologischen Methoden wie passive Hämagglutination, indirekte Fluoreszenzantikörperteste (IFA), Enzymimmunoassays (EIA) sowie Radioimmunoassays (RIA) nachweisbar. Für den MELISA™ TAB Anti-Tg wird Humanthyroglobulin verwendet. Für den MELISA™ TAB Anti-TPO wird rekombinante humane Thyreoidale Peroxidase verwendet, so dass die bei anderen mikrosomalen Antigenpräparationen häufig zu falschen Ergebnissen führenden Verunreinigungen mit Thyroglobulin und/oder Mitochondrien ausgeschlossen sind. Beide Teste liegen im EIA-Format vor.

3. Testprinzip

Die MELISA™ TAB Teste sind Dreischritt-Enzymimmunoassays (nichtkompetitives "Sandwich"-Prinzip), die mit Hilfe antigenbeschichteter Micropins durchgeführt werden. Diese Technologie ist ideal für das Screening grosser Probenaufkommen auf das Vorhandensein von Schilddrüsenautoantikörpern.

Erster Reaktionsschritt (1. Inkubation)

Die MELISA™ TAB-Micropins sind bereits mit gereinigtem Antigen beschichtet (Humanthyroglobulin bzw. rekombinante Thyreoidale Peroxidase). Wenn die Micropins in die mit Standards, Kontrollen oder verdünnten Patientenproben beschickten Vertiefungen eingetaucht werden, binden die Anti-Tg- bzw. Anti-TPO-Antikörper – sofern vorhanden - an die Oberfläche der Micropins. Die Micropins werden anschliessend wieder herausgenommen und mit Waschlösung gewaschen.

Zweiter Reaktionsschritt (2. Inkubation)

Im zweiten Reaktionsschritt werden die Micropins in Vertiefungen, die Anti-IgG-Myeloperoxidase-Konjugat enthalten, getaucht. Das Konjugat bindet an die vorhandenen thyreoidalen Autoantikörper. Ungebundenes Konjugat wird durch einen Waschlösungsschritt entfernt.

Dritter Reaktionsschritt (3. Inkubation)

Anschliessend werden die Micropins in Vertiefungen, die ein farbloses Substrat enthalten, eingetaucht. Nach Abstoppen der Reaktion mit der Stopplösung (im Kit enthalten) wird die Extinktion photometrisch auf einem Mikrotiterplattenreader gemessen. Dabei ist die Intensität der Gelbfärbung proportional zur Konzentration der während der ersten Inkubation gebundenen Schilddrüsenautoantikörper.

4. Packungsinhalt

5 Standards* (1,0 mL), gebrauchsfertig 1 Set

Konzentration	Anti-Tg IU/mL	Anti-TPO IU/mL
Standard 1	0	0
Standard 2	300	100
Standard 3	750	250
Standard 4	3000	1000
Standard 5	7500	2500

(* Der MELISA™TAB Anti-Tg/TPO Kombikit, Code M2496, enthält 2 x 5 Standards, d.h. je 1 Set Anti-Tg- und 1 Set Anti-TPO-Standards).

Waschlösungskonzentrat (25-fach)	1 x 20 mL
Probendiluent, gebrauchsfertig	1 x 100 mL
Konjugat (Anti-IgG-Myeloperoxidase), gebrauchsfertig	1 x 12 mL
Substrat (enthält TMB*), gebrauchsfertig	1 x 21 mL
Stopplösung (Oxalsäure), gebrauchsfertig	1 x 12 mL
96 antigenbeschichtete Micropins (im Folienbeutel)	1 Set
Positiv –Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1mL
Negativ-Kontrolle, gebrauchsfertig	1 x 1mL
Flachboden-Mikrotiterplatte	1
Rundboden-Mikrotiterplatten	2
Waschschalen	2
Gebrauchsinformation	1
Qualitätskontrollzertifikat	1

* TMB = 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin