

**TECO**medical Group

# **TECO®** *TSH-Récepteurs*

**TECO® Dosage ELISA de 2ème  
génération des Auto-Anticorps  
Anti-Récepteurs de la TSH**

**Mode d'Emploi  
Français**



Catalogue No. TE1010

## Symbol Description



*Consulter le Mode d'Emploi*



*Numéro de Lot*



*Date de Pérépition*



*CE Déclaration de Conformité*



*Température de Stockage*



*Fabriqué par*



*TE 1010*



**96**  
*Tests*



*Attention: caustique*



*Intèrèt*

### **TECOmedical AG** Siège du groupe **TECOmedical**

Gewerbstrasse 10  
4450 Sissach  
Suisse

phone + 41(0)61 985 81 00  
fax + 41(0)61 985 81 09

mail [info@tecomedical.com](mailto:info@tecomedical.com)  
web [www.tecomedical.com](http://www.tecomedical.com)

---

#### Services techniques:

Allemagne 0800 985 99 99  
France 0 800 100 437  
Benelux +31(0)33 4951 473

Où contactez votre représentant local.

# TECO® Dosage ELISA de 2<sup>ème</sup> génération des Auto-Anticorps Anti-Récepteurs de la TSH

## Matériel fourni:

Symboles	Description	Format
<b>1</b>	<b>Microplaque recouverte de récepteur de TSH</b> 12 barrettes sécables de 8 puits (96 puits au total), sur un support, prêtes à l'emploi	1 plaque
<b>2</b>	<b>Tampon</b> Prêt à l'emploi, solution jaune	1 x 10 ml
<b>A</b>	<b>Standard A</b> 0 U/l (IgG, humain), prêt à l'emploi, bouchon bleu	1 x 1,0 ml
<b>B</b>	<b>Standard B</b> 1 U/l (IgG, humain), prêt à l'emploi	1 x 1,0 ml
<b>C</b>	<b>Standard C</b> 2 U/l (IgG, humain), prêt à l'emploi	1 x 1,0 ml
<b>D</b>	<b>Standard D</b> 8 U/l (IgG, humain), prêt à l'emploi	1 x 1,0 ml
<b>E</b>	<b>Standard E</b> 40 U/l (IgG, humain), prêt à l'emploi	1 x 1,0 ml
<b>L</b>	<b>Contrôle 1</b> (IgG, humain) prêt à l'emploi, bouchon jaune, valeur indiquée sur la fiche de contrôle	1 x 1,0 ml
<b>H</b>	<b>Contrôle 2</b> (IgG, humain) prêt à l'emploi, bouchon jaune, valeur indiquée sur la fiche de contrôle	1 x 1,0 ml
<b>3</b>	<b>TSH biotylée</b> TSH marquée par de la Biotine, lyophilisée	3 x 4,5 ml
<b>4</b>	<b>Tampon pour TSH biotylée</b> Prêt à l'emploi, solution rouge	1 x 15 ml
<b>5</b>	<b>Conjugué enzymatique HRP (SA-HRP)</b> Streptavidine marquée à la Péroxydase, concentré 20 fois	1 x 0,75 ml
<b>6</b>	<b>Diluant pour SA-HRP</b> Prêt à l'emploi	1 x 15 ml
<b>7</b>	<b>Substrat TMB</b> TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , prêt à l'emploi	1 x 15 ml
<b>8</b>	<b>Solution de Lavage</b> Concentrée 10 fois	1 x 100 ml
<b>9</b>	<b>Solution d'Arrêt - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M</b> Acide sulfurique 0.5 M, prête à l'emploi	1 x 10 ml
	<b>Mode d'emploi</b>	1 x



## **Stockage**

Conserver le kit à 2–8 °C. Ne pas congeler. Conserver les réactifs inutilisés à 2–8 °C.

## **Intérêt du dosage**

Le kit TECO® ELISA de 2<sup>ème</sup> génération permet le dosage quantitatif des auto-anticorps anti-récepteur de la TSH dans le sérum humain (Rees Smith et al., 2004). L'hyperthyroïdisme dans la maladie de Basedow est du à la présence d'auto-anticorps anti-récepteur de la TSH. Le dosage de ces anticorps peut être utile pour le diagnostic et le suivi de cette pathologie.

## **Intérêt clinique**

Une atteinte primaire de la thyroïde se développe souvent à la suite d'un processus auto-immun qui entraîne la formation d'anticorps dirigés contre un ou plusieurs des 3 auto-antigènes thyroïdiens suivants: la thyropéroxydase (TPO), la thyroglobuline (TG) et le récepteur (TR) de la TSH (thyrotropine).

Les auto-anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH peuvent provoquer un hyperthyroïdisme (maladie de Basedow). Cette maladie atteint environ 2% des femmes et 0.2% des hommes.

Les auto-anticorps dirigés contre le récepteur de la TSH sont hétérogènes si l'on considère leur mode d'action biologique. Certains anticorps peuvent avoir un effet stimulant ou bloquant sur le récepteur de la TSH: il y a par exemple des anticorps qui stimulent la croissance de la thyroïde et des anticorps qui inhibent la fixation de la TSH sur son récepteur (TBII, "TSH-binding inhibitory immunoglobulins").

On peut observer des changements dans l'activité biologique des auto-anticorps d'un patient: on peut observer par exemple le passage d'un effet de blocage de l'activité à un effet de stimulation, l'inverse étant plus rare. Le dosage des auto-anticorps anti-récepteur de la TSH permet surtout de caractériser les patients que l'on soupçonne d'être atteints de la maladie de Basedow. La maladie de Basedow est une atteinte auto-immune, caractérisée par une hyperactivité thyroïdienne (hyperthyroïdisme). D'autres symptômes importants sont le goitre, l'exophtalmie, et la tachycardie.

Ce dosage permet aussi de différencier cliniquement la maladie de Basedow des hyperthyroïdies autonomes diffuses de la thyroïde. Près de 98 % des patients atteints de la maladie de Basedow sont positifs pour ce test.

Le dosage, réalisé chez les patients atteints de la maladie de Basedow, a une valeur prédictive et est un outil important pour le suivi thérapeutique. Des taux élevés d'auto-anticorps anti-récepteur de TSH, chez des patients atteints de la maladie de Basedow et ayant eu un traitement thyrostatique au long cours, témoignent d'un risque élevé de rechute.

De plus, une augmentation de ces auto-anticorps au cours du 3<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse chez des femmes atteintes de la maladie de Basedow témoigne d'une hyperthyroïdie du fœtus. Chez les femmes enceintes, atteintes de thyroïdite de Hashimoto et de myxoedème, des auto-anticorps anti-récepteur de la TSH à effet bloquant peuvent passer dans le placenta et provoquer un hypothyroïdisme temporaire néonatal.

Ce dosage peut être également utile en ophtalmologie car de nombreux patients, présentant des symptômes de la maladie de Basedow, consultent d'abord un ophtalmologiste.

## Références

- 1 Rees Smith B et al. (2004)  
**A new assay for thyrotropin-receptor-auto-antibodies.**  
Thyroid 14: 830-835.
- 2 Kamijo K (2003)  
**TSH receptor-antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH receptor.**  
Endocrine Journal 50: 113-116.
- 3 Rees Smith B (2001)  
**Thyroid autoantibodies.**  
The Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation Supplement 61: 45-52.
- 4 Orgiazzi J (2000)  
**Anti-TSH receptor-antibodies in clinical practice.**  
Endocrinology and Metabolism Clinics of North America 29: 339-355.
- 5 Gupta MK (2000)  
**Thyrotropin-receptor-antibodies in thyroid diseases: advances in detection techniques and clinical applications.**  
Clinica Chimica Acta 293: 1-29.
- 6 Bolton J, Sanders J, Oda Y, Chapman C, Konno R, Furmaniak J, Rees Smith B (1999)  
**Measurement of thyroid-stimulating hormone receptor autoantibodies by ELISA.**  
Clinical Chemistry 45: 2285-2287.

## Principe du dosage

Ce kit ELISA permet de doser quantitativement in vitro les auto-anticorps anti-récepteur de la thyrotropine humaine dans le sérum humain.

**La microplaque contient 12 barrettes de 8 puits (96 puits au total), recouverts d'un récepteur de TSH porcin.**

Un anticorps monoclonal spécifique du récepteur de la TSH permet de fixer le récepteur sur les puits. Les auto-anticorps anti-récepteur humain de la thyrotropine (TSH) ont la même réactivité vis-à-vis des récepteurs porcins ou humains de la TSH.

Lors de la première étape du dosage, on incube le sérum du patient. Dans les échantillons positifs, les anticorps spécifiques se lient aux récepteurs de la TSH. Les anticorps liés empêchent la fixation de la TSH biotinylée, ajoutée dans les puits lors de la deuxième étape. On mesure ensuite la quantité de biotine fixée au cours de la troisième étape, en ajoutant de la streptavidine marquée par un enzyme (conjugué enzymatique) qui provoque une réaction colorée. L'intensité de la réaction colorée est inversement proportionnelle à la concentration d'anticorps anti-récepteur de la TSH présents dans l'échantillon. Zone de mesure: 1-40 U/l (NIBSC 90/672)

Brevets:

Brevet Européen:1021721, Brevet US 6,844,162 B1 et Brevet Japonais 4331403

## Matériel nécessaire mais non fourni

- Pipettes pouvant distribuer 50 µl, 100 µl et 350 µl
- Récipients gradués pour reconstituer ou diluer les réactifs
- Laveur automatique ou multipette
- Eau distillée
- Agitateur vortex
- Lecteur de microplaques ELISA 96 puits, capable de mesurer à 450 nm (Référence: 590-650 nm)
- Agitateur de plaques ELISA (500 tr/min) (agitation orbitale)
- Logiciel de traitement des données
- Couvercle de plaques ELISA

## Précautions d'Emploi

Ce kit est destiné exclusivement à un usage in vitro.

### **Suivre avec attention le Mode d'Emploi.**

Les réactifs sont stables jusqu'aux dates de péremption mentionnées sur les étiquettes, sous réserve des conditions de stockage. Suivre les recommandations pour le stockage des réactifs reconstitués. Se reporter à la "Fiche de Sécurité" pour plus de détails concernant les précautions d'utilisation.

On a utilisé du matériel d'origine humaine pour la préparation de certains réactifs. Bien que ce matériel soit négatif pour HIV-1, HIV-2 ainsi que pour les anticorps HCV et l'HbsAg, on doit le manipuler comme s'il était potentiellement infectieux.

Le matériel d'origine animale utilisé dans ce kit provient d'animaux certifiés sains : on doit toutefois le manipuler comme s'il était potentiellement infectieux.

TECOmedical AG ne peut être tenu pour responsable en cas de perte ou de problème faisant suite à un non respect du protocole.

1. Pour utilisation in vitro.
2. Traiter tous les échantillons à tester comme potentiellement infectieux. Appliquer les précautions requises et les bonnes pratiques de laboratoire lors de la manipulation du kit et des échantillons de patients.
3. Eliminer les réactifs en respectant la législation en vigueur.
4. Utiliser ensemble les réactifs du kit avant la date de péremption qui figure sur l'étiquette externe.
5. Conserver les réactifs comme indiqué dans le mode d'emploi.
6. Ne pas utiliser les barrettes de puits recouverts si le sachet est détérioré.
7. Tester chaque échantillon en double.
8. L'utilisation de multipipette ou de distributeur automatique est recommandée afin d'assurer une bonne distribution des réactifs.
9. L'acide sulfurique 0.5 M peut causer des brûlures sévères. Ne pas ingérer. Eviter tout contact avec la peau, les yeux ou les vêtements. En cas de contact, rincer immédiatement à l'eau. En cas d'ingestion, appeler un médecin.
10. On utilise l'azide de sodium comme conservateur. Le contact ou l'ingestion de tampons contenant de l'azide de sodium peut causer une irritation de la peau, des yeux ou de la bouche. L'azide de sodium peut réagir avec le plomb ou le cuivre des canalisations et former des azides de métaux explosifs. Lors de son élimination, utiliser une grande quantité d'eau pour empêcher toute accumulation.

## Préparation des Réactifs

- 1 Puits recouverts de récepteur de TSH**

12 barrettes de 8 puits (96 au total) sur un support et dans un sachet d'aluminium scellé. Fixer les barrettes fermement sur le support. Après ouverture, conserver les barrettes inutilisées dans le sachet d'origine en aluminium et fermer celui-ci. Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- 2 Tampon**

10 ml, prêt à l'emploi.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- A à E Standards**

5 x 1.0 ml, prêts à l'emploi. 0 U/l, 1 U/l, 2 U/l, 8 U/l et 40 U/l. Calibrés contre le Standard WHO 90/672. Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- L Contrôle 1**

1.0 ml, prêt à l'emploi. Valeur indiquée sur la fiche de QC.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- H Contrôle 2**

1.0 ml, prêt à l'emploi. Valeur indiquée sur la fiche de QC.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- 3 TSH biotinylée**

3 x 4.5 ml, lyophilisée. Reconstituer chaque flacon à l'aide de 4.5 ml de Tampon pour TSH biotinylée **4**. Si l'on utilise plus d'un flacon, pooler les flacons après reconstitution et bien mélanger avant utilisation. Conserver à 2–8 °C pendant un maximum de 12 semaines après reconstitution.
- 4 Tampon pour TSH biotinylée**

15 ml, prêt à l'emploi.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.
- 5 Conjugué enzymatique (SA-HRP)**

1 x 0.75 ml, concentré. Diluer 1: 20 à l'aide du Diluant pour SA-HRP **6**.  
Par exemple, 0.6 ml **5** + 11.4 ml **6**. Conserver à 2–8 °C pendant un maximum de 12 semaines après dilution.
- 6 Diluant pour SA-HRP**

15 ml, prêt à l'emploi.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.

**7 Substrat TMB**  
15 ml, prêt à l'emploi.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.

**8 Solution de lavage concentrée**  
100 ml, concentrée. Compléter à 1 litre avec de l'eau distillée avant utilisation.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration du kit.

**9 Solution d'Arrêt – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M**  
10 ml, prête à l'emploi.  
Conserver à 2–8 °C jusqu'à la date d'expiration.

## Préparation et Stabilité des Echantillons de Sérum

### Type d'échantillon

Sérum humain.

### Stabilité

Les échantillons de sérum à tester peuvent être conservés 5 jours à température ambiante ou 10 jours à 2–8 °C. Ne pas utiliser des sérums lipidiques ou hémolysés. **Ne pas utiliser de plasmas.**

Les sérums doivent être dosés aussitôt après séparation ou conservés sous forme d'aliquotes, de préférence à -20°C. 250 µl suffisent pour un dosage (on recommande de doser des duplicatas de 100 µl). Eviter les congélations/décongélations répétées. Avant le dosage, décongeler les sérums à température ambiante et mélanger. Une conservation inadéquate peut entraîner une perte de l'activité des auto-anticorps anti-récepteur de la TSH.

## Dosage

Laisser tous les réactifs et les échantillons à doser à température ambiante (20-25 °C) pendant un minimum de 30 minutes. Il est souhaitable de doser en duplicate les échantillons de sérum, les calibrateurs et les contrôles.

1. Préparer le support et le nombre nécessaire de barrettes de puits recouverts **1**. Identifier les puits qui correspondent aux Standards, Contrôles et Echantillons. En particulier pour les automates ELISA, il est recommandé de commencer par le standard 40 U/l et de terminer par le contrôle négatif et les sérums à tester.
2. Pipeter 50 µl de Tampon **2** dans chaque puits.
3. Pipeter 100 µl de sérums de patients, Standards **A** à **E**, et Contrôles **L** et **N** dans les puits correspondants.
4. Couvrir les puits et agiter pendant 2 heures à température ambiante (20–25 °C) sur un agitateur de plaques ELISA (500 tr/min).
5. Après incubation, aspirer le contenu des puits, laver à 2 reprises à l'aide de 350 µl de Solution diluée de Lavage. Aspirer le liquide de lavage à l'aide de l'automate de lavage, ou décanter en retournant le support sur un récipient approprié. Tapoter doucement les puits retournés sur du papier absorbant afin d'éliminer complètement la solution de lavage.
6. Pipeter 100 µl de solution de TSH biotinylée reconstituée **3** dans chaque puits. Éviter toute projection de liquide hors des puits lors de l'addition du réactif.
7. Couvrir les puits et incuber à température ambiante pendant 25–30 minutes, sans agiter.
8. Laver à 3 reprises comme indiqué dans l'étape 5.
9. Pipeter 100 µl de solution diluée de Conjugué enzymatique (SA-HRP) dans chaque puits et incuber à température ambiante pendant 25–30 minutes sans agiter.
10. Répéter l'étape 8.
11. Pipeter 100 µl TMB **7** dans chaque puits et incuber dans l'obscurité à température ambiante pendant 25–30 minutes sans agiter.
12. Pipeter 50 µl de Solution d'Arrêt **9** dans chaque puits, agiter la plaque pendant environ 5 secondes sur un agitateur de plaques et lire l'absorption dans les 15 minutes qui suivent.
13. Lire l'absorption de chaque puits à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA (Filtre de référence : 590–650 nm).

**Des protocoles sont disponibles pour différents automates.**

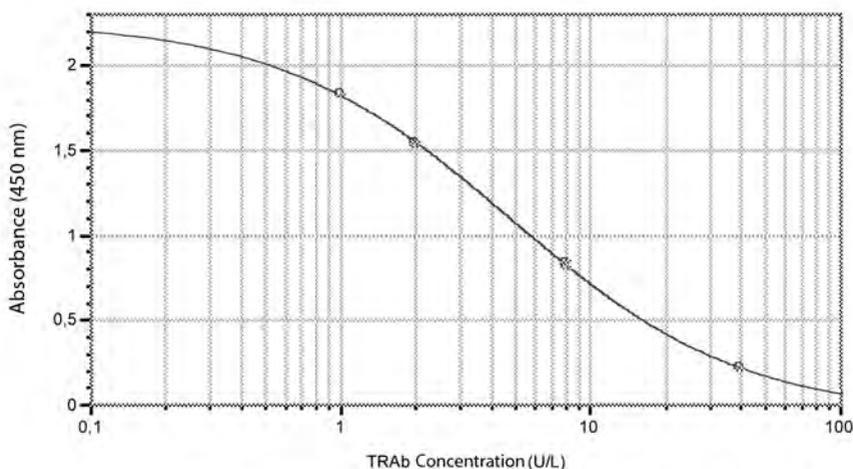
## Calcul des résultats

On peut établir une courbe de calibration en reportant la concentration des standards sur l'axe des x (échelle logarithmique) en fonction de leur absorption sur l'axe des y (échelle linéaire). On lira à partir de la courbe standard la concentration d'auto-anticorps anti-récepteur de la TSH correspondant à chaque échantillon de patient. Pour le traitement des données, utiliser de préférence un système à 4 paramètres.

### Exemple de résultats à 450 nm

(Ces données ne sont données qu'à titre d'exemple. Ne pas les utiliser pour le calcul des résultats)

Echantillon	Absorption à 450 nm	U/l
A	2.248	0
B	1.829	1
C	1.535	2
D	0.827	8
E	0.211	40
L-Contrôle 1	2.01	< 1
H-Contrôle 2	1.180	4.1



$$y = \left( \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} \right) + D$$

○ STD#1 (Standards: Concentration vs MeanValue)

A      B      C      D      R<sup>2</sup>  
 2,25    0,936    4,857    -0,071    1

Pour chaque dosage, les résultats obtenus pour les contrôles doivent se situer dans la fourchette correspondant à chaque lot. La fiche de QC donnant les valeurs cibles est fournie dans le kit. Si les valeurs obtenues pour les contrôles ne se trouvent pas dans la fourchette indiquée, les résultats doivent être considérés comme douteux et les échantillons redosés.

## Valeurs de Référence

### Fourchette de valeurs recommandée

Négatif	< 1.0
Douteux	1.0–2.0
Positif	> 2.0

## Etude clinique

### Spécificité clinique

154 échantillons provenant de donneurs sains ont été dosés à l'aide du dosage des auto-anticorps anti-récepteur de la TSH par méthode ELISA. 99 % ont été considérés comme négatifs pour les auto-anticorps anti-récepteur de la TSH.

### Sensibilité clinique

50 échantillons de patients atteints de la maladie de Basedow ont été dosés à l'aide de ce kit. 49 (98%) ont été considérés comme positifs pour les auto-anticorps anti-récepteur de la TSH. 1(2%) a été considéré comme douteux.

### Précision clinique

L'analyse d'échantillons de patients atteints de maladies autoimmunes autres que la maladie de Basedow n'a pas mis en évidence d'interférences provenant des auto-anticorps anti-thyroglobuline, thyropéroxydase, acide glutamique décarboxylase, 21-hydroxylase, récepteur à l'acétylcholine, dsDNA ou facteur rhumatoïde.

### Interférence

On n'a pas observé d'interférence après avoir surchargé des échantillons par: Hémoglobine jusqu'à 5 mg/ml, bilirubine jusqu'à 0.2 mg/ml, intralipides jusqu'à 30 mg/ml, LH humaine jusqu'à 10 U/ml, hCG jusqu'à 160 U/ml, FSH humaine jusqu'à 70 U/ml et TSH humaine jusqu'à 30 U/l.

## Performance du test

### Calibration

Ce dosage est calibré contre le 1. International Standard for Thyroid stimulating antibodies (WHO, 1995, Standard 90/672, National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, England).

### Précision

#### (Inter essais)

Echantillon	Valeur Moyenne (U/l)	CV % (n=6)
1	1.4	7.6
2	1.9	4.0
3	2.7	5.0
4	3.4	8.6
5	19.7	6.0

#### (Intra essai)

Echantillon	Valeur Moyenne (U/l)	CV % (n=6)
1	3.26	4.3
2	5.50	0.8
3	7.77	1.6
4	17.82	5.9

### Limite de détection

On a dosé à 16 reprises le contrôle négatif du kit et on a calculé la moyenne et la déviation standard. La limite de détection pour +2 déviations standard est égale à 0.25 U/l.

## Test de Dilution

Echantillon	Facteur de Dilution	Attendu U/l	Observé U/l	Récupération (%)
Sérum 1	1	41.30	41.30	100.00
	2	20.60	25.90	125.40
	4	10.30	12.20	117.80
	8	5.20	5.80	112.50
	16	2.60	2.90	110.90
Sérum 2	1	31.60	31.60	100.00
	2	15.80	17.10	108.40
	4	7.90	8.40	106.30
	8	4.00	4.30	109.20
	16	2.00	2.50	126.50
Sérum 3	1	41.00	41.00	100.00
	2	20.50	22.40	109.30
	4	10.30	10.40	101.20
	8	5.10	4.70	91.20
	16	2.60	2.30	89.50
Sérum 4	1	18.70	18.70	100.00
	2	9.40	9.20	98.00
	4	4.70	4.50	96.40
	8	2.30	2.50	107.20
	16	1.20	1.60	133.50
Sérum 5	1	28.70	28.70	100.00
	2	14.30	16.00	111.70
	4	7.20	7.70	108.10
	8	3.60	3.90	109.30
	16	1.80	1.90	106.40
Sérum 6	1	9.00	9.00	100.00
	2	4.50	4.50	100.80
	4	2.20	2.40	107.50
	8	1.10	1.20	110.60
	16	0.60	0.70	130.00

## Test de Récupération

On a surchargé 4 sérums négatifs à l'aide de 8 concentrations différentes d'anticorps anti-récepteur de TSH (2-30 U/l)

Echantillon	Récupération moyenne %
A	121
B	109
C	106
D	117

## Remarque

Ces données ne sont données qu'à titre d'exemple. Il est préférable que chaque laboratoire utilise ses propres contrôles et établisse ses propres valeurs normales et pathologiques d'anticorps anti-récepteur de TSH.

## TECO® Dosage de 2ème génération des Auto-Anticorps Anti-Récepteur de la TSH

### Résumé du Dosage

- Amener les échantillons et les réactifs à température ambiante (20-25°C).
- Reconstituer chaque flacon de TSH biotinylée **5** avec 4.5 ml de Tampon **4**
- Diluer la Solution concentrée de lavage **6** en complétant à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Diluer SA-HRP **8** au 1:20 avec le Diluant **6** : par exemple: 0.6 + 11.4 ml.

Préparer le nombre nécessaire de barrettes de puits

Pipeter **50 µl** de Tampon **2** dans chacun des puits

Pipeter **100 µl** de Standards **A** à **E**, Contrôles **L** et **H** et Echantillons dans les puits

Recouvrir les puits et incuber pendant **120 minutes** à 20-25°C sur un agitateur (500 tr/min)

Aspirer, laver **2 x** avec **350 µl** au moins de Tampon de lavage et aspirer ou décanter les puits sur du papier absorbant

Ajouter **100 µl** de TSH biotinylée reconstituée dans chacun des puits

Recouvrir les puits et incuber pendant **25-30 minutes** à 20-25°C

Aspirer, laver **3 x** avec **350 µl** au moins de Tampon de lavage et aspirer ou décanter les puits sur du papier absorbant

Ajouter **100 µl** de SA-HRP diluée dans chacun des puits

Recouvrir les puits et incuber pendant **25-30 minutes** à 20-25°C

Aspirer, laver **3 x** avec **350 µl** au moins de Tampon de lavage et aspirer ou décanter les puits sur du papier absorbant

Ajouter **100 µl** de TMB **7** dans chacun des puits

Recouvrir et incuber les puits pendant **25-30 minutes** à 20-25°C dans l'obscurité, sans agitation

Pipeter **50 µl** de Solution d'Arrêt **9** dans chacun des puits et bien mélanger pendant 5 secondes

Mesurer l'absorption à **450 nm**

Filtre de référence 590-650 nm

Logiciel de quantification, 4-paramètres:

$$y = (A-D)/(1+(x/C)^B)+D$$



Lire le Mode d'Emploi complet avant d'utiliser le Résumé du Dosage