

Thyreoglobulin ELISA Kit

*Zur in-vitro-Bestimmung des Thyreoglobulin und dessen
Wiederfindungsrate in Serum und Plasma*

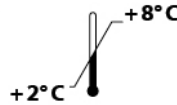
Thyreoglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of thyreoglobulin
and its recovery rate in serum and plasma*

Gültig ab / Valid from 30.09.2013



K 7510A



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, D-64625 Bensheim

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 849430

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1. VERWENDUNGSZWECK	2
2. EINLEITUNG	2
3. INHALT DER TESTPACKUNG	2
4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	3
5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN	3
6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG	4
<i>Vorbereitung der Testdurchführung</i>	4
7. TESTDURCHFÜHRUNG	5
<i>Testprinzip</i>	5
<i>Pipettierschema</i>	5
8. ERGEBNISSE	7
9. EINSCHRÄNKUNGEN	7
10. QUALITÄTSKONTROLLE	8
<i>Normwerte</i>	8
11. TESTCHARAKTERISTIKA	8
<i>Präzision und Reproduzierbarkeit</i>	8
<i>Wiederfindung in der Verdünnung</i>	8
<i>Analytische Sensitivität</i>	8
<i>Spezifität</i>	8
12. VORSICHTSMASSNAHMEN	8
13. TECHNISCHE MERKMALE	9
14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST	9

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene ELISA ist für die quantitative Bestimmung von humanem Thyreoglobulin in Serum und Plasma geeignet. Nur zur *in-vitro*-Diagnostik.

2. EINLEITUNG

Humanes Thyreoglobulin (hTG), ein komplexes, jodiertes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 660 000 Da, ist ein spezifisches Syntheseprodukt der Schilddrüse. Thyreoglobulin dient als Matrix für die Schilddrüsenhormonsynthese von T3 bzw. T4 und gleichzeitig als Hormonspeicher. Dementsprechend handelt es sich um das quantitativ wichtigste Protein der Schilddrüse. In geringen Mengen ist hTG auch unter physiologischen Bedingungen in der Zirkulation mittels Sandwich-Immunoassay nachweisbar. Der hTG-Gehalt ist erhöht bei follikulärem bzw. papillärem Schilddrüsenkarzinom, Schilddrüsenadenom, subacuter bzw. Hashimoto Thyreoiditis und Graves-Basedow Erkrankungen. Bei Patienten mit medullärem Schilddrüsenkarzinom sind die hTG-Konzentrationen nicht erhöht. Niedrige hTG-Werte weisen auf eine Thyrotoxicosis factitia hin. Bestimmung von hTG ist sehr hilfreich zur Mitbeurteilung von Remissionen bei Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom oder bei einer an die Operation anschließenden Behandlung mit radioaktivem Jod. hTG wird zusätzlich zu Jod-131 bestimmt, jedoch nicht als dessen Ersatz. Des weiteren kann die Bestimmung von hTG im Serum auch bei der Behandlung von Kindern mit angeborener Hypothyreose nützlich sein.

Indikationen

- Postoperative Verlaufskontrolle des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms
- Konnatale Hypothyreose
- Hyperthyreose factitia
- Tumorrezidive bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom

3. INHALT DER TESTPACKUNG

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7510A MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7510A WP	WASHBUF	ELISA-Waschpufferkonzentrat, 10x	1 x 100 ml
K 7510 AK	CONJ	Konjugat, Kaninchen anti-hTG-Antikörper, peroxidase-markiert, gebrauchsfertig	1 x 15 ml

Art.-Nr.	Bezeichnung	Kit-Komponenten	Menge
K 7510A KO1	CTRL 1	Kontrolle 1, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 7510A KO2	CTRL 2	Kontrolle 2, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	1 vial
K 7510A ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 4; 8; 16; 31; 62; 125; 250 µg/l)	1 x 8 vials
K 7510A TMB	SUB	TMB-Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7510A AC	STOP	ELISA-Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7510A AP	ASYBUF	Assaypuffer, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
K 7510A SP	SPIKE	hTG-Konzentrat, gebrauchsfertig (40 µg/l)	2 x 2,5 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Reinstwasser*
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Pipettenspitzen für den Einmalgebrauch mit variablen Volumina von 5–1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Vortex-Mixer
- Zentrifuge, 3000 g
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

5. VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Bitte achten Sie bei mehrfachem Einsatz der Platte darauf, dass die Reagenzien wie in der Vorschrift beschrieben gelagert und **nur die für den jeweiligen Ansatz benötigten Reagenzienmengen frisch angesetzt werden**. Der Kit

kann so bis zu 3 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.

- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden, um Volumenverluste zu vermeiden.
- Das **Waschpufferkonzentrat** (WASHBUF) muss vor Gebrauch **1:10 in Reinstwasser** verdünnt werden (100 ml Konzentrat + 900 ml Reinstwasser), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich bei Raumtemperatur bzw. im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2–8 °C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** (Waschpuffer) ist bei **2–8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **STD** (Standards), **CTRL** (Kontrollen) und **SPIKE** (hTG-Konzentrat) können für **4 Wochen** bei **2–8 °C** gelagert werden. Langzeitlagerung bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei -20 °C.
- Alle anderen Testreagenzien sind bei **2–8 °C** zu lagern und bei entsprechender Lagerung bis zum angegebenen Verfallsdatum (siehe Etikett) verwendbar.

6. PROBENVORBEREITUNG UND -LAGERUNG

Plasma und Serum

Frisch abgenommenes Blut sollte innerhalb einer Stunde abzentrifugiert werden. Es kann entweder am gleichen Tag im Test eingesetzt oder bei -20 °C gelagert werden. Lipämische oder hämolysierte Proben können zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Vor dem Einsatz im Test sollten die Proben gut gemischt werden. Wir empfehlen alle Proben in Doppelbestimmungen zu analysieren.

Vorbereitung der Testdurchführung

Zur Vorbereitung der Testdurchführung werden die Reagenzien vorverdünnt.

Reihe 1	150 µl je STD (Standards) und CTRL (Kontrollen) in beschriftete Reaktionsgefäße pipettieren. Jeweils 150 µl AP (Assaypuffer) zugeben und mischen.
Reihe 2	Je 150 µl Probe in ein beschriftetes Reaktionsgefäß pipettieren. Jeweils 150 µl AP zugeben und mischen.

Reihe 3	Je 150 µl Probe in ein beschriftetes Reaktionsgefäß pipettieren. Jeweils 150 µl SP (hTG-Konzentrat) zugeben und mischen.
---------	--

7. TESTDURCHFÜHRUNG

Testprinzip

Der Test basiert auf der Sandwich-ELISA-Technik. Es werden zwei ausgewählte polyklonale Antikörper, die humanes Thyreoglobulin (hTG) erkennen, verwendet.

Standards, Kontrollen und Patientenproben, die auf humanes Thyreoglobulin zu untersuchen sind, werden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit einem hochaffinen polyklonalen anti-human-Thyreoglobulin-Antikörper beschichtet wurden. In diesem ersten Inkubationsschritt wird das humane Thyreoglobulin aus der Probe von dem gekoppelten Fängerantikörper gebunden. Dann wird das Konjugat (ein Peroxidase-markierter polyklonaler Kaninchen anti-hTG-Antikörper) zugegeben und es bildet sich folgender Komplex an der Wand der Mikrotiterplatte: Fängerantikörper–humanes Thyreoglobulin–Peroxidase-Konjugat. Als Peroxidasesubstrat wird Tetramethylbenzidin (TMB) eingesetzt. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Säure abgestoppt. Dadurch erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wird photometrisch bei 450 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Thyreoglobulin-Gehalt direkt proportional. Parallel dazu wird eine Standardkurve – optische Dichte (Absorption bei 450 nm) versus Standardkonzentration – erstellt, aus der die Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Pipettierschema

1.	Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (15–30 °C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen. Immer Doppelbestimmungen durchführen.
2.	Die Positionen für Reihe I, II und III (siehe Kapitel „Vorbereitung der Testdurchführung“) im Protokollblatt markieren.
3.	Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2–8 °C gelagert werden.

4.	Die Mikrotiterstreifen 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5.	Je 100 µl von Reihe I, II und III (siehe Kapitel „Vorbereitung der Testdurchführung“) in Doppelbestimmungen in die Mikrotiterplatte pipettieren.
6.	Streifen abdecken und über Nacht bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
7.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8.	100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren.
9.	Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubieren.
10.	Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5 x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
11.	100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren.
12.	10–20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren*.
13.	100 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen.
14.	Extinktion sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) messen. Ist keine Referenzwellenlänge vorhanden, wird nur bei 450 nm gelesen. Falls die Extinktion des höchsten Standards den Messbereich des Photometers übersteigt, sollte sofort bei 405 nm gegen 620 nm (690 nm) gemessen werden.

* Die Intensität der Farbentwicklung ist temperaturabhängig. Es wird empfohlen den Farbumschlag während der Inkubationszeit zu beobachten und entsprechend der Farbentwicklung die Reaktion zu stoppen.

Hinweis

Eine Wiederfindungsrate von 90-100% ist nur bei Inkubation über Nacht gewährleistet. Abweichende Inkubationszeiten bzw. Inkubationstemperaturen können die Ergebnisse beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik übernimmt für die

hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung. Es wird daher die eigene Validierung der Inkubationsparameter und die Etablierung eigener Normwerte empfohlen.

Der Assay kann auch auf verschiedenen Automaten, u.a. auf dem ETILAB der Firma Sorin/Biomedica, eingesetzt werden.

8. ERGEBNISSE

Die unten beschriebenen mathematischen Modelle können alternativ zur Auswertung benutzt werden. Wir empfehlen die 4-Parameter-Funktion:

1. 4-Parameter-Funktion

Für die optische Dichte empfehlen wir eine lineare Ordinate und für die Konzentration eine logarithmische Abszisse (bei einer logarithmischen Abszisse muss für den Standard mit der Konzentration 0 ein Wert kleiner 1 eingegeben werden z. B. 0,001).

2. Punkt-zu-Punkt-Auswertung

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

3. Gewichtete Spline-Funktion

Für die optische Dichte und für die Konzentration empfehlen wir eine lineare Ordinate bzw. Abszisse.

Vor jeder automatischen Auswertung sollte stets eine Kontrolle der Doppelwerte auf Plausibilität („Ausreißerkontrolle“) durchgeführt werden; falls dies nicht durch das verwendete Programm erfolgt, sollte die Kontrolle manuell durchgeführt werden.

9. EINSCHRÄNKUNGEN

Proben, deren OD höher ist als die des höchsten Standards, sollten 1:10 mit Assaypuffer verdünnt und nochmals im Assay eingesetzt werden.

Zum Beispiel:

50 µl Probe + **450 µl** Assaypuffer (AP)

Die ermittelte Konzentration der 1:10 verdünnten Proben muss mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert werden.

10. QUALITÄTSKONTROLLE

Immundiagnostik empfiehlt den Einsatz von externen Kontrollen für die interne Qualitätskontrolle, wenn möglich.

Wir empfehlen, bei jedem Testansatz Kontrollen mitzumessen. Die Ergebnisse der Kontrollen müssen auf Richtigkeit überprüft werden. Liegen eine oder mehrere Kontrollen außerhalb des angegebenen Bereiches, kann Immundiagnostik die Richtigkeit der Messergebnisse nicht gewährleisten.

Normwerte

Plasma oder Serum: < 50 µg/l

Wir empfehlen jedem Labor, einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

11. TESTCHARAKTERISTIKA

Präzision und Reproduzierbarkeit

Intra- und Inter-Assay-Variation (VK%) wurde mit hTG-haltigen Proben innerhalb verschiedener Verdünnungsreihen geprüft. Der Intra-Assay-VK war 10,2%, während der Inter-Assay-VK als 14,8% aus Messungen mit drei verschiedenen ELISA-Chargen ermittelt wurde.

Wiederfindung in der Verdünnung

Zwei Proben mit bekannter hTG-Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Der lineare Bereich erstreckt sich von 2,5–250 µg/l.

Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$. Gemessen wurde 20-mal der Standard null. Die Messungen ergaben eine Nachweisgrenze von 1 µg/l.

Spezifität

Es wurde keine Kreuzreaktivität zu anderen Proteinen im Serum bzw. Plasma gefunden.

12. VORSICHTSMASSNAHMEN

- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in-vitro*-Diagnostik verwendet werden.

- Qualitätskontrollen sollten immer mitgemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befunden. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen Natriumazid oder ProClin. Natriumazid bzw. ProClin sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind als giftig und karzinogen beschrieben. Jeder Kontakt mit Haut oder Schleimhaut ist zu vermeiden.
- Die Stopplösung besteht aus verdünnter Schwefelsäure (H_2SO_4). H_2SO_4 ist eine starke Säure und muss auch in verdünnter Form mit Vorsicht benutzt werden. H_2SO_4 verursacht bei Kontakt mit der Haut Verätzungen. Es sollte daher mit Schutzhandschuhen, Schutzkleidung und Schutzbrille gearbeitet werden. Bei Kontakt mit der Säure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

13. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden. Ferner dürfen Kavitäten unterschiedlicher Mikrotiterplatten, selbst der gleichen Charge, nicht zusammengefügt und zur Analyse verwendet werden, da schon geöffnete Mikrotiterplatten anderen Bedingungen unterliegen als verschlossene.
- Die Reagenzien dürfen nach Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums nicht mehr verwendet werden.
- Substratlösung muss vor Gebrauch farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen während den Inkubationen mit Folie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.
- Der Assay ist immer nach der im Kit beigelegten Arbeitsanleitung durchzuführen.

14. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD-Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.

- Für die Qualitätskontrolle sind die für medizinische Laboratorien erstellten Richtlinien zu beachten.
- Die Testcharakteristika wie Inkubationszeiten, Inkubationstemperaturen und Pipettiervolumina der verschiedenen Komponenten wurden vom Hersteller festgelegt. Nicht mit dem Hersteller abgesprochene Veränderungen in der Testdurchführung können die Resultate beeinflussen. Die Firma Immundiagnostik AG übernimmt für die hierdurch entstandenen Schäden und Folgeschäden keine Haftung.
- Bei Gewährleistungsansprüchen ist das beanstandete Material mit schriftlicher Erklärung innerhalb von 14 Tagen zum Hersteller, der Immundiagnostik AG, zurück zu senden.

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

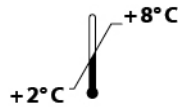
Thyroglobulin ELISA Kit

*For the in vitro determination of thyroglobulin
and its recovery rate in serum and plasma*

Valid from 30.09.2013



K 7510A



Immundiagnostik AG

Table of Contents

1. INTENDED USE	13
2. INTRODUCTION	13
3. MATERIAL SUPPLIED	13
4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	14
5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS	14
6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	15
<i>Preparation of the run</i>	15
7. ASSAY PROCEDURE	15
<i>Principle of the test</i>	15
<i>Test procedure</i>	16
8. RESULTS	17
9. LIMITATIONS	18
10. QUALITY CONTROL	18
<i>Normal range</i>	18
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	18
<i>Precision and reproducibility</i>	18
<i>Dilution recovery</i>	18
<i>Analytical sensitivity</i>	19
<i>Specificity</i>	19
12. PRECAUTIONS	19
13. TECHNICAL HINTS	19
14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE	20

1. INTENDED USE

The described ELISA is intended for the quantitative determination of human thyroglobulin (hTG) in plasma and serum. It is for in vitro diagnostic use only.

2. INTRODUCTION

Human thyroglobulin (hTG) is a large glycoprotein (MW 660.000 Da) that is stored in the follicular colloid of the thyroid gland. It functions as a prohormone in the intrathyroid synthesis of T3 and T4. Traditionally circulating levels of hTG have been measured using double antibody immunoassays. HTG is evaluated in thyroid follicular and papillary carcinoma, thyroid adenoma, subacute thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis and Grave's disease. HTG levels are not increased in patients with medullary thyroid carcinoma. Low hTG concentrations are an indication that thyrotoxicosis factitia may be present. Measurement of hTG is most useful in detecting recurrence of differentiated thyroid carcinoma following surgical resection or radioactive iodine ablation. HTG determination is used as an adjunct to iodine 131 scanning but not as a replacement for it. Assessment of serum hTG also aids in the management of infants with congenital hypothyroidism.

Indications

- Postoperative monitoring of differentiated thyroid carcinoma
- Congenital hypothyroidism
- Hyperthyreosis factitia
- Tumor recurrence in patients with thyroid carcinoma

3. MATERIAL SUPPLIED

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7510A MTP	PLATE	Holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7510A WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 7510A K	CONJ	Conjugate, rabbit-anti-hTG antibodies, peroxidase-labeled, ready to use	1 x 15 ml
K 7510A KO1	CTRL 1	Control 1, ready to use (see specification for range)	1 vial
K 7510A KO1	CTRL 2	Control 2, ready to use (see specification for range)	1 vial
K 7510A ST	STD	Standards, ready to use (0; 4; 8; 16; 31; 62; 125; 250 µg/l)	1 x 8 vials

Cat. No.	Label	Kit components	Quantity
K 7510A TMB	SUB	Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution, ready to use	1 x 15 ml
K 7510A AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml
K 7510A AP	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	1 x 10 ml
K 7510A SP	SPIKE	hTG concentrate, ready to use (40 µg/l)	2 x 2.5 ml

4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Ultra pure water*
- Laboratory balance
- Calibrated precision pipettors and 10-1000 µl tips
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- Multi-channel pipets or repeater pipets
- Centrifuge, 3000 g
- Vortex
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run assay more than once, ensure that reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare only the appropriate amount necessary for each run.** The kit can be used up to 3 times within the expiry date stated on the label.
- Reagents with a volume less than **100 µl** should be centrifuged before use to avoid loss of volume.
- The **ELISA wash buffer concentrate** (WASHBUF) should be diluted **1:10 in ultra pure water** before use (100 ml concentrate + 900 ml ultra pure water), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals must be redissolved at room temperature or 37 °C before dilution of the buffer solutions. The **buffer concentrate** is stable at **2–8 °C** until the expiry date stated on the label. **Diluted buffer solution** (wash buffer) can be stored in a closed flask at **2–8 °C for one month**.

- **STD** (standards), **CTRL** (control) and **SPIKE** (hTG concentrate) can be stored at 2–8°C for 4 weeks. Long term storage until the expiry date given on the label at –20°C only.
- All other test reagents are ready to use. Test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2–8°C**.

6. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum and plasma

Fresh collected blood should be centrifuged within one hour. Store samples at -20°C if not assayed on the same day. Lipemic or hemolytic samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicate analyses for each sample.

Preparation of the run

Before each run of the assay, the reagents have to be prediluted.

Series 1	Pipet 150 µl of each STD (standard) and CTRL (control) in a labelled test tube. Add 150 µl AP (assay buffer) to each tube and mix.
Series 2	Pipet each 150 µl sample in a labelled reaction tube. Add 150 µl AP and mix.
Series 3	Pipet each 150 µl sample in a labelled reaction tube. Add 150 µl SP (hTG-Konzentrat) and mix.

7. ASSAY PROCEDURE

Principle of the test

The assay utilizes the sandwich technique with two selected polyclonal antibodies that bind to human thyroglobulin.

Standards, controls and patient samples which are assayed for human thyroglobulin are added into the wells of a microplate coated with a high affine polyclonal anti-human thyroglobulin antibody. During the first incubation step, thyroglobulin is bound by the immobilized antibody. Then a peroxidase-conjugated polyclonal rabbit anti human thyroglobulin antibody is added into each microtiter well and a sandwich of capture antibody–human thyroglobulin–peroxidase-conjugate is formed. Tetramethylbenzidine (TMB) is used as peroxidase substrate. Finally, an acidic stop

solution is added to terminate the reaction. The color changes from blue to yellow. The intensity of the yellow color is directly proportional to the concentration of thyroglobulin. A dose response curve of the absorbance unit (optical density, OD at 450 nm) vs. concentration is generated, using the values obtained from the standard. Thyroglobulin present in the patient samples is determined directly from this curve.

Test procedure

Wash the pre-coated microtiter plate **5 x with 250 µl ELISA wash buffer before use**. After the final washing step, the inverted microtiter plate should be tapped on absorbent paper.

Carry out the tests in duplicate.

1.	Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (15–30 °C) and mix well. Perform analysis always in duplicate.
2.	Mark the positions of series I, II, and III (see chapter “Preparation of the run”) on a protocol sheet.
3.	Take microtiter strips out of the kit. Store unused strips covered at 2–8 °C. Strips are stable until the expiry date stated on the label.
4.	Wash each well 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
5.	Pipet each 100 µl of series I, II, and III (see chapter “Preparation of the run”) in duplicates into the respective wells of the microtiter plate.
6.	Cover the plate tightly and incubate overnight at room temperature on a horizontal mixer.
7.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.
8.	Add 100 µl of CONJ (conjugate) into each well.
9.	Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature on a horizontal mixer.
10.	Discard the contents of each well. Wash 5 times by dispensing 250 µl of diluted wash buffer into each well. After the final washing step remove residual buffer by tapping the plate on absorbent paper.

11.	Add 100 µl of SUB (substrate) into each well.
12.	Incubate for 10–20 minutes at room temperature in the dark*.
13.	Add 100 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly.
14.	Determine absorption immediately with an ELISA reader at 450 nm against 620 nm (or 690 nm) as a reference. If no reference wavelength is available, read only at 450 nm. If the extinction of the highest standard exceeds the range of the photometer, absorption must be measured immediately at 405 nm against 620 nm as a reference.

* The intensity of the color change is temperature sensitive. We recommend observing the color change and stopping the reaction upon good differentiation.

Note

A recovery rate of 90-100% is achieved only by overnight incubation. Any variation of the incubation time or temperature may influence the results of the test. Therefore, if the test has been performed under modified conditions, Immundiagnostik AG can not be held responsible for any errors resulting from the alteration. If the incubation conditions are changed, we recommend each laboratory to optimize the corresponding parameter and to estimate the norm concentration range.

The assay can be run automatically, e.g. using the ETILAB instrument of Sorin/Bio-medica.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend using the “4 parameter algorithm”.

1. 4 parameter algorithm

It is recommended to use a linear ordinate for the optical density and a logarithmic abscissa for the concentration. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator must be specified with a value less than 1 (e.g. 0.001).

2. Point-to-point calculation

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

3. Spline algorithm

We recommend a linear ordinate for the optical density and a linear abscissa for the concentration.

The plausibility of the pairs of values should be examined before the automatic evaluation of the results. If this option is not available with the programme used, the paired values should be evaluated manually.

9. LIMITATIONS

Samples with an OD higher than the OD of the highest calibrator should be diluted 1:10 with assay buffer and re-assayed.

For example:

50 µl sample + **450 µl** assay buffer (AP)

The obtained concentration of the samples which are diluted 1:10 have to be multiplied with the dilution factor of 10.

10. QUALITY CONTROL

Immundiagnostik recommends the use of external controls for internal quality control, if possible.

Control samples should be analysed with each run. Results, generated from the analysis of control samples, should be evaluated for acceptability using appropriate statistical methods. The results for the patient samples may not be valid if within the same assay one or more values of the quality control sample are outside the acceptable limits.

Normal range

Serum/plasma: < 50 µg/l

We recommend each laboratory to establish its own norm concentration range.

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Precision and reproducibility

Intra- (CV%) and inter-assay (CV%) variations were determined using hTG containing samples within different concentration ranges. The intra-assay CV was 10.2 %, whereas 14.8 % was obtained for the inter-assay CV using three different kit batches.

Dilution recovery

The linearity of the assay was determined by serial dilutions of material with known hTG concentration with the assay buffer. The linearity is in the range of 2.5 - 250 µg/l.

Analytical sensitivity

The Zero-standard was measured 20 times. The detection limit was set as $B_0 + 2 SD$ and estimated to be 1 µg/l.

Specificity

The described hTG assay is highly specific. No cross reactivity with other proteins in plasma and serum was observed.

12. PRECAUTIONS

- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- Control samples should be analyzed with each run.
- Human materials used in kit components were tested and found to be negative for HIV, Hepatitis B and Hepatitis C. However, for safety reasons, all kit components should be treated as potentially infectious.
- Kit reagents contain sodium azide or Proclin as bactericides. Sodium azide and Proclin are toxic. Substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- The stop solution consists of diluted sulphuric acid, a strong acid. Although diluted, it still must be handled with care. It can cause burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped up immediately with copious quantities of water. Do not breath vapour and avoid inhalation.

13. TECHNICAL HINTS

- Do not interchange different lot numbers of any kit component within the same assay. Furthermore we recommend not assembling wells of different microtiter plates for analysis, even if they are of the same batch as wells from already opened microtiter plates are exposed to different conditions than sealed ones.
- Reagents should not be used beyond the expiration date stated on kit label.
- Substrate solution should remain colourless until use.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

- The assay should always be performed according the enclosed manual.

14. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- Quality control guidelines should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, which is not coordinated with the producer, may influence the results of the test. Immundiagnostik AG can therefore not be held responsible for any damage resulting from incorrect use.
- Warranty claims and complaints regarding deficiencies must be logged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG along with a written complaint.

Used symbols:



Temperature limitation



Catalogue Number



In Vitro Diagnostic Medical Device



Contains sufficient for <n> tests



Manufacturer



Use by



Lot number