

Thyreoglobulin ELISA Kit

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

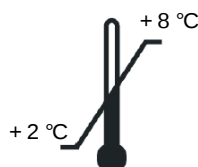
Thyroglobulin ELISA Kit

*For the in vitro Determination of Thyroglobulin and its Recovery
Rate in Serum and Plasma*

Gültig ab / Vvalid from 13.02.2008



K 7510 A



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 / Content

1. Deutsch
2. English

Weitere Informationen zu unseren Produkten finden Sie auf unserer
Homepage

Additional information about our products is available on our homepage

www.immundiagnostik.com

1. VERWENDUNGSZWECK

Der hier beschriebene Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (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-Immunoassays 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

Artikel Nr.	Inhalt	Kit Komponenten	Menge
K 7510MTP	PLATE	Mikrotitermodul, vorbeschichtet	12 x 8 Vertiefungen
K 7510WP	WASHBUF	ELISA Waschpufferkonzentrat 10x	1 x 100 ml
K 7510K	CONJ	Konjugat, Kaninchen anti-hTG-Antikörper, peroxidase-markiert gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7510KO	CTRL	Kontrolle, gebrauchsfertig (Bereich der Spezifikation entnehmen)	2 vials
K 7510ST	STD	Standards, gebrauchsfertig (0; 4; 8; 16; 31; 62; 125; 250 µg/l)	2 x 8 vials
K 7510TMB	SUB	TMB Substrat (Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7510AC	STOP	ELISA Stopplösung, gebrauchsfertig	1 x 15 ml
K 7510AP	ASYBUF	Assay Puffer, gebrauchsfertig	1 x 10 ml
K 7510 A SP	SPIKE	hTG-Konzentrat, gebrauchsfertig (35 µg/l)	1 x 2,5 ml

4. ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- Bidestilliertes Wasser (aqua bidest.)
- Laborwaage
- Präzisionspipetten und Einmalpipettenspitzen mit variablen Volumina von 10 - 1000 µl
- Folie zum Abkleben der Mikrotiterplatte
- Mikrotiterplattenschüttler
- Multikanal- bzw. Multipipette
- Zentrifuge, 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Laborübliche Glas- oder Plastikröhrchen (Einmalartikel)
- Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450 nm (Referenzfilter 620 oder 690 nm)

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 4 x je nach Probenaufkommen bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum verwendet werden.
- Reagenzien mit einem **Volumen kleiner als 100 µl** sollten vor Gebrauch zentrifugiert werden um Volumenverluste zu vermeiden.
- Der **WASHBUF** (Waschpufferkonzentrat) muss vor Gebrauch **1:10** in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) verdünnt werden (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), gut mischen. Aufgrund der hohen Salzkonzentration in den Stammlösungen kann es zu Kristallbildungen kommen. Die Kristalle lösen sich im Wasserbad bei 37 °C auf. Das **Pufferkonzentrat** kann bei **2-8°C** bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum aufbewahrt werden. Die **verdünnte Pufferlösung** ist bei **2-8 °C einen Monat** in einem geschlossenen Gefäß haltbar.
- **STD** (Standards), **CTRL** (Kontrolle) 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

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.

Proben mit einem hTG Gehalt > 250 µg/l sind im Verhältnis **1:10** mit Assay Puffer zu verdünnen.

Zum Beispiel:

50 µl Probe + **450 µl** Assay Puffer (AP)

Hinweis

Bei Bestimmung der Wiederfindungsrate werden **3** Probenreihen angesetzt:

Reihe I: **50 µl** Standard/Kontrolle + **50 µl** Assay Puffer (AP)

Reihe II: **50 µl** Probe+ **50 µl** Assay Puffer (AP)

Reihe III: **50 µl** Probe+ **50 µl** hTG-Konzentrat (SP)

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

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, die Raumtemperatur (18-26°C) aufweisen. Vor Gebrauch Reagenzien und Proben gut mischen. **Immer Doppelbestimmungen durchführen**

Die Positionen für **Reihe I** - STD/CTRL (Standards/Kontrolle), **Reihe II** – SAMPLE (Proben) und **Reihe III** – SAMPLE-RR (Proben-Wiederfindungsrate) im Protokollblatt markieren

Die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Kit nehmen. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können abgeklebt bis zum angegebenen Haltbarkeitsdatum bei 2-8 °C gelagert werden

Die Mikrotiterstreifen **5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer** waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen

50 µl STD/CTRL (Standards/Kontrolle) - **Reihe I**, **50 µl** SAMPLE (Proben) - **Reihe II** und **50 µl** SAMPLE-RR (Proben-Wiederfindungsrate) - **Reihe III** in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen pipettieren. Anschließend zu:
STD/CTRL - **Reihe I: 50 µl Assay Puffer**,
SAMPLE - **Reihe II: 50 µl Assay Puffer** und
SAMPLE-RR - **Reihe III: 50 µl hTG-Konzentrat pipettieren**

Streifen abdecken und **über Nacht bei Raumtemperatur** unter Schütteln inkubieren

Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem Waschpuffer waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
100 µl CONJ (Konjugat) in alle Vertiefungen pipettieren
Streifen abdecken und 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Schütteln inkubieren
Inhalt der Vertiefungen verwerfen und 5x mit je 250 µl verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen. Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen
100 µl SUB (Substrat) in alle Vertiefungen pipettieren
10 - 20 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) im Dunkeln inkubieren*
50 µl STOP (Stopplösung) in alle Vertiefungen pipettieren, gut mischen
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 Immunodiagnostik AG 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. 0.01).

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 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. 0.01).

Die Kalibrationskurve ist nicht linear, deshalb wird eine Punkt-zu-Punkt-Auswertung empfohlen.

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.

Serum und Plasma

Um die Thyreoglobulin Konzentration in verdünnten **Serum und Plasma** Proben zu berechnen, wird die ermittelte Konzentration mit **10** multipliziert.

9. QUALITÄTSKONTROLLE

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

Erwartete Ergebnisse

Normwerte

Plasma oder Serum: < 50 µg/l

Wir empfehlen jedem Labor einen eigenen Normwertbereich zu etablieren.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

Sensitivität

Der Null-Standard wurde mehrfach (n=20) vermessen. Von der ermittelten Optischen Dichte wurde der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Nachweisgrenze wurde festgelegt als $B_0 + 2 \text{ SD}$ (Null-Standard + 2 Standardabweichungen). Sie beträgt 1 µg/l.

Kreuzreaktivität

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

Linearität

Zwei Proben mit bekannter hTG-Konzentration wurden seriell verdünnt und vermessen. Der lineare Bereich erstreckt sich von 2.5-250 µg/l.

Präzision

Intra- (CV%) und Inter-Assay-Variation (CV%) wurde mit hTG-haltigen Proben innerhalb verschiedener Verdünnungsreihen geprüft. Der Intra-Assay CV war 10.2 %, während der Inter-Assay CV als 14.8 % aus Messungen mit drei verschiedenen ELISA-Chargen ermittelt wurde.

11. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Nur zur *in vitro* Diagnostik.
- Qualitätskontrollen sollten immer mit gemessen werden.
- Das für Kitkomponenten verwendete humane Material wurde auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet und für negativ befundet. Dennoch wird empfohlen, die Kitkomponenten als Vorsichtsmaßnahme immer wie potentiell infektiöses Material zu behandeln.
- Die Kitkomponenten enthalten Natriumazid oder Thimerosal zum Schutz vor bakteriellen Kontaminationen. Natriumazid bzw. Thimerosal sind giftig. Auch Substrate für enzymatische Farbreaktionen sind giftig und karzinogen. 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 verwendet 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 Schwefelsäure muss die verätzte Stelle sofort mit viel Wasser gespült werden.

12. TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien der Kitpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.
- 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.
- Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien sollte vermieden werden.
- Die Bestimmung ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.

13. ALLGEMEINE HINWEISE ZUM TEST

- Dieser Kit wurde nach der IVD Richtlinie 98/79/EG hergestellt und in den Verkehr gebracht.
- Alle im Kit enthaltenen Reagenzien dürfen ausschließlich zur *in vitro* Diagnostik verwendet werden.
- 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.

13.02.2008 09022005_hTG_Wiederf.doc

Verwendete Symbole:



Temperaturbegrenzung



Bestellnummer



In-Vitro-Diagnostikum



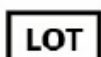
Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen



Hersteller



Verwendbar bis



Chargenbezeichnung

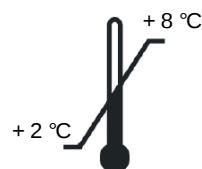
Thyroglobulin ELISA Kit

*For the in vitro Determination of Thyroglobulin and its Recovery
Rate in Serum and Plasma*

Valid from 13.02.2008



K 7510 A



1. INTENDED USE

The described Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (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

Catalogue No	Content	Kit Components	Quantity
K 7510MTP	PLATE	One holder with precoated strips	12 x 8 wells
K 7510WP	WASHBUF	ELISA wash buffer concentrate 10x	1 x 100 ml
K 7510K	CONJ	Conjugate, rabbit-anti-hTG antibodies, peroxidase-labeled, ready to use	1 x 15 ml
K 7510KO	CTRL	Control, ready-to-use	2 vials
K 7510ST	STD	Standards, ready to use (0; 4; 8; 16; 31; 62; 125; 250 µg/l)	2 x 8 vials
K 7510TMB	SUB	Tetramethylbenzidin (TMB) substrate solution, ready to use	1 x 15 ml
K 7510AC	STOP	ELISA stop solution, ready to use	1 x 15 ml
K 7510AP	ASYBUF	Assay buffer, ready to use	1 x 10 ml
K 7510 A SP	SPIKE	hTG-concentrate, ready to use (35 µg/l)	1 x 2,5 ml

4 MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Bidistilled water (aqua bidest.)
- Laboratory balance
- Precision pipettors and disposable tips to deliver 10-1000 µl
- Foil to cover the microtiter plate
- Horizontal microtiter plate shaker
- A multi-channel dispenser or repeating dispenser
- Centrifuge capable of 3000 x g
- Vortex-Mixer
- Standard laboratory glass or plastic vials, cups, etc.
- Microtiter plate reader at 450 nm
(reference wave length 620 or 690 nm)

5. PREPARATION AND STORAGE OF REAGENTS

- To run the assay more than one time, make sure that the reagents are stored at the conditions stated on the label. **Prepare just the appropriate amount necessary for the assay.** The kit can be used up to 4 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 **WASHBUF** (ELISA wash buffer concentrate) should be diluted with aqua bidest. **1:10** before use (100 ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest.), mix well. Crystals could occur due to high salt concentration in the stock solutions. The crystals have to be redissolved at 37°C using a water bath before dilution. The **WASHBUF** is stable at **2-8°C** until the expiry date stated on the label. Diluted **buffer solution** 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. The test reagents are stable until the expiry date (see label of test package) when stored at **2-8°C**.

6. SAMPLE 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.

The **serum** and **plasma** samples should be diluted **1:10** with assay buffer if their hTG concentration is higher than 250 µg/L.

For example:

50 µl sample + 450 µl assay buffer (AP)

Note

For determination of the recovery rate 2 sample series should be assayed:

Series I: 50 µl standard/control + 50 µl assay buffer (AP)

Series II: 50 µl sample + 50 µl assay buffer (AP)

Series III: 50 µl sample + 50 µl hTG-concentrate (SP)

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. Tetra-methylbenzidine (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

Prior to use in the assay allow all reagents and samples to come to room temperature (18-26 °C) and mix well. **Perform analysis always in duplicate**

Mark the positions of **Series I** - STD/CTRL (standards/control), **Series II** - SAMPLE (samples) and **Series III** - SAMPLE-RR (samples-Recovery Rate) on a protocol sheet

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

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

Add **50 µl** of STD/CTRL (standards/control) - **Series I**, **50 µl** of SAMPLE (samples) - **Series II** and **50 µl** of SAMPLE-RR (samples-Recovery Rate) - **Series III** in duplicate into respective well.

Then add to:

STD/CTRL - **Series I: 50 µl assay buffer,**

SAMPLE - **Series II: 50 µl assay buffer and**

SAMPLE-RR - **Series III: 50 µl hTG-concentrate**

Cover the plate tightly and incubate **overnight at room temperature** on a horizontal mixer

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
Add 100 µl of CONJ (conjugate) into each well
Cover the plate tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18-26°C) on a horizontal mixer
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
Add 100 µl of SUB (substrate) into each well
Incubate for 10 - 20 minutes at room temperature (18-26°C) in the dark*
Add 50 µl of STOP (stop solution) into each well, mix thoroughly
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 to observe the color change and to stop 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/Biomedica.

8. RESULTS

The following algorithms can be used alternatively to calculate the results. We recommend to use 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 has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

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 for the optical density a linear ordinate and for the concentration a logarithmic abscissa. When using a logarithmic abscissa, the zero calibrator has to be specified with a value smaller than 1 (e. g. 0.01).

THE CALIBRATION CURVE IS NOT LINEAR, therefore a point-to-point-calculation - algorithm is recommended.

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 used program, a control of the paired values should be done manually.

Serum and plasma

For the calculation of the thyroglobulin concentration in diluted **plasma and serum** samples the result has to be multiplied by **10**.

9. QUALITY CONTROL

Control samples should be analyzed 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.

Expected values

Normal ranges

Serum/plasma: < 50µg/l

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

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Sensitivity

The detection limit of this hTG ELISA was determined to $B_0 + 2SD$. The limit is 1 µg/l.

Cross reactivity

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

Linearity

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.

Precision data

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.

11. PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use only.
- The quality control guidelines should be followed.
- Human material used in the kit components was 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.
- Reagents of the kit package contain sodium azide or thimerosal as bactericides. Sodium azide and thimerosal are toxic. The substrates for the enzymatic color reactions are toxic and carcinogenic. Avoid contact with skin or mucous membranes.
- Stop solution is composed of sulfuric acid, which is a strong acid. Even diluted, it still must be handled with care. It can cause acid burns and should be handled with gloves, eye protection, and appropriate protective clothing. Any spill should be wiped out immediately with copious quantities of water.

12. TECHNICAL HINTS

- Do not mix different lot numbers of any kit component within the same assay.
- Reagents should not be used beyond the expiration date shown on the 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.

13. GENERAL NOTES ON THE TEST AND TEST PROCEDURE

- This assay was produced and distributed according to the IVD guidelines of 98/79/EC.
- All reagents in the kit package are for *in vitro* diagnostic use only.
- The guidelines for medical laboratories should be followed.
- Incubation time, incubation temperature and pipetting volumes of the components are defined by the producer. Any variation of the test procedure, not in accordance with manufacturer's recommendations, may influence the results of the test. Therefore, Immundiagnostik AG accepts no responsibility for experimental data resulting from any modifications or incorrect use of the product.
- Warranty claims and complaints in respect of deficiencies must be lodged within 14 days after receipt of the product. The product should be send to Immundiagnostik AG together with a written complaint.

13.02.2008 09022005_hTG_Wiederf.DOC

Used symbols:

	Temperature limitation		Catalogue Number
	In Vitro Diagnostic Medical Device		Contains sufficient for <n> tests
	Manufacturer		Use by
	Lot number		