

Anti-TG kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung von Thyreoglobulin-Autoantikörpern in humanem Blutserum
(Gebrauchsanweisung: Seite 5)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of autoantibodies to thyroglobulin in human serum
(Instructions for use: page 27)

Manueller Test / Manual test
 Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 13
Abschnitt / Section 14

IVD

Anti-TG Kit
 (Manueller Test)
 Anti-TG kit (manual test)



96 Untersuchungen
 96 tests

24-07

REF

Anti-TG Kit (Automatisierter
 Test für "Alisei")
 Anti-TG kit (automated test
 for "Alisei")

























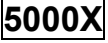


96 Untersuchungen
 96 tests

24-07 A

REF

1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
	Bestellnummer Catalogue number		Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
	Herstellungsdatum Date of manufacture		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
			
	Kalibratoren Calibrators		Optische Dichte Optical density
	Kontrolle Control		Analysenpuffer Assay buffer
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Ausreichend für <n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated
	Konjugat Conjugate		

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Anti-TG Testkit** ist zur **quantitativen** Bestimmung der **Autoantikörper gegen Thyreoglobulin (TG)** in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 24-07** Für den manuellen Gebrauch;
REF 24-07 A Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei",
hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;
Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkit:*

- REF 24-07 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";
REF 24-07 nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

Thyreoglobulin-Autoantikörper (Anti-TG) gehören meist zu den Immunglobulinen der Klasse G und seltener zu den Immunglobulinen der Klassen A und M. Im Blutserum gesunder Personen können die Thyreoglobulin-Autoantikörper eine Konzentration bis 65 U/ml erreichen. Ein Überschreiten dieser Konzentration weist auf eine autoimmune Störung hin, die in der Regel zur Funktionsstörung der Schilddrüse führt.

Die quantitative Bestimmung der Anti-TG-Konzentration in menschlichem Blutserum wird bei der Diagnose autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen (Hashimoto-Thyreoiditis, idiopathisches Myxödem, Basedow-Krankheit) genutzt.

3. TESTPRINZIP

Der **Anti-TG Testkit** wird für die quantitative Bestimmung der TG-Autoantikörper aller Immunglobulin-Klassen genutzt. Während der ersten Inkubation binden die Anti-TG-Antikörper der Kalibratoren und der zu testenden Probe an das TG, das an der Innenfläche der Kavitäten der Mikrotiterplatte gekoppelt ist. Während der zweiten Inkubation reagieren die an TG gebundenen Antikörper mit dem TG-HRP-Konjugat. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zum Anti-TG-Level in der Probe (Abb.1).

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Anti-TG-Konzentration der Probe. Die Anti-TG-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

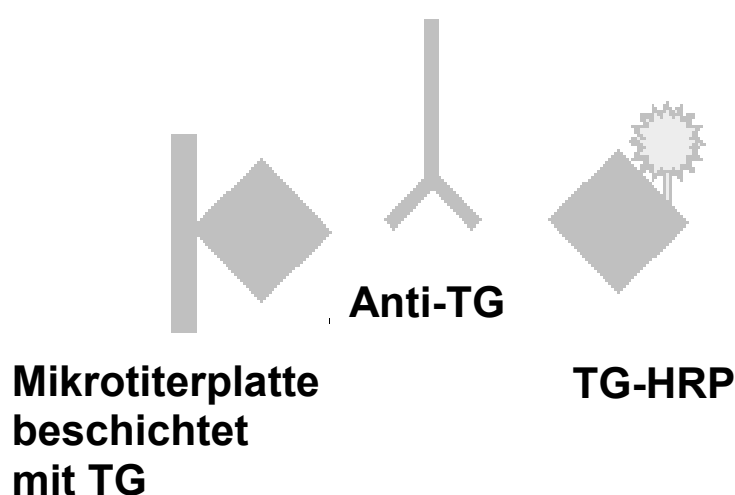


Abb. 1 Testschema

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Anti-TG Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig. Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 12 Monate. Nach der Öffnung ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösung-Konzentrates, der Stopplösung und dem Analysenpuffer: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;

- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämischer (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Blutserum-Proben sind bei +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Anti-TG Testkits** wurden 120 Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr bei gesunden 21-45 jährigen Männern und Frauen entnommen wurden, untersucht. Die ermittelten Anti-TG-Konzentrationswerte überschritten nicht 65 U/ml.

Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe. Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Anti-TG-Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur lagern. Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle:

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten: Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst. Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.

0,5 ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert. Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist. Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen die zu testenden Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **Anti-TG Testkit** wurde gegen den ersten Internationalen Referenzstandard der WHO 65/093 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Die hohe Spezifität des Testkits wird durch hoch aufgereinigtes TG gewährleistet, welches keine detektierbare Kreuzreaktivität mit Auto-Antikörpern gegen Thyroidperoxidase oder Autoantikörper gegen den TSH-Rezeptor aufweist.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Anti-TG Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 7,5 U/ml.

Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (plus 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **Anti-TG Testkit** (manuelles und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion einer Anti-TG-Konzentration innerhalb eines Bereiches von 7,5- 1200 U/ml.

10.5 Hook-Effekt:

Für den **Anti-TG Testkit** wurde kein High-Dose-Hook-Effekt beobachtet.

10.6 Messeinheit:

Im **Anti-TG Testkit** sind die Konzentrationen der Kalibratoren in U/ml angegeben. Zur Umrechnung in µg/ml wird der Konzentrationswert in U/ml durch 33,3 geteilt.

10.7 Intra-assay und Inter-assay Varianz (Präzision):

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Anti-TG-Konzentration, U/ml	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	51	3,6	7,1
2	78	4,4	5,6
3	122	5,2	4,3
4	156	7,3	4,7
5	179	5,5	3,1
6	677	27,1	4,0
7	891	31,2	3,5
8	1115	23,4	2,1

Alisei Testkit

Probe	Mittlere Anti-TG-Konzentration, U/ml	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	61	3,1	5,1
2	106	3,9	3,7
3	146	5,9	4,0
4	199	7,2	3,6
5	253	8,4	3,3
6	536	14,5	2,7
7	773	20,1	2,6
8	1108	22,9	2,1

Um einen **inter-assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von 1 Woche von verschiedenen Anwendern untersucht.

Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Anti-TG-Konzentration, U/ml			Inter-assay VK	
	1 Test	2 Test	3 Test	SD	VK, %
1	37	43	32	4,2	9,9
2	61	66	64	3,5	5,4
3	112	121	118	6,7	5,3
4	160	175	188	10,6	6,1
5	357	348	326	6,4	1,8
6	664	701	675	26,2	3,7
7	1086	998	1009	62,2	6,2
8	1172	1063	1103	77,1	7,3

Alisei Testkit


Probe	Mittlere Anti-TG-Konzentration, U/ml			Inter-assay VK	
	1 Test	2 Test		1 Test	2 Test
1	62	69	72	5,1	7,6
2	104	111	107	3,5	3,3
3	139	159	156	10,8	7,1
4	200	219	210	9,5	4,5
5	232	259	249	13,6	5,5
6	541	543	520	12,7	2,4
7	800	769	782	15,6	2,0
8	1120	1159	1183	31,8	2,7


11. GRENZEN DER METHODE

Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden. Aufgrund der heterogenen Natur humaner Auto-Antikörper könnten Verdünnungen der Proben keiner Parallelität unterliegen



12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.
- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 M Salzsäure (HCl–Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;

- Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden.
- Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
- Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
- Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Anti-TG-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
 -  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis.

Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Patienten Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
 -  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden.

Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;

- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 24-07)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit aufgereinigtem TG.	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus TG konjugiert mit HRP	14 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Anti-TG Kalibratoren : Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Anti-TG-Konzentration: 0; 50; 150; 300; 600; 1200 U/ml. Die exakten Anti-TG-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Anti-TG Kontrolle Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Anti-TG-Menge. Der exakte Anti-TG-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2 x 14 ml konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 M HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
ASSAYB	Analysenpuffer	14 ml, gebrauchsfertig

13.2 Erforderliche aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **Anti-TG Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen ist der Testkit für die **quantitative Bestimmung** von 40 Unbekannten, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und des Blank (OD der TMB-Lösung) in Zweifachbestimmung ausreichend.

13.3.1 Testdurchführung

(Testschema, Abschnitt 13.5)

- A. **100 µl Analysenpuffer** **ASSAYB** in alle Kavitäten pipettieren; **2 Kavitäten, A1-A2, bleiben frei (Blank)!**
- B. **50 µl der Kalibratoren** **CAL** (0-5), **Kontrolle** **CONTROL** und **Patientenproben** in **Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren.
- C. **30 Minuten** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) bei **+37 °C** inkubieren
- D. 5x, wie unten beschrieben, waschen.
- E. **120 µl Konjugat** **CONJ** in alle Kavitäten, **außer** Kavitäten, **A1-A2**, pipettieren.
- F. **30 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.
- G. 5x, wie unten beschrieben, waschen.
- H. **100 µl des Substrates** **SUB** in jede Kavität pipettieren (auch Blank); Streifen entweder bei **Raumtemperatur** (+18...+25 °C) **im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbtintensität) oder für **10 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.
- I. In alle Kavitäten (auch Blank) **100 µl der Stopplösung** **STOP** in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.
- J. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm** innerhalb von **20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen.

Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel werfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand werfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welches keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert.

Beispiel:

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 5 $\geq 1,0$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Flaschenetikett angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige Anti-TG-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Anti-TG-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

Eine Extrapolation der Standardkurve für Anti-TG-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 1200 U/ml), ist nicht zulässig.

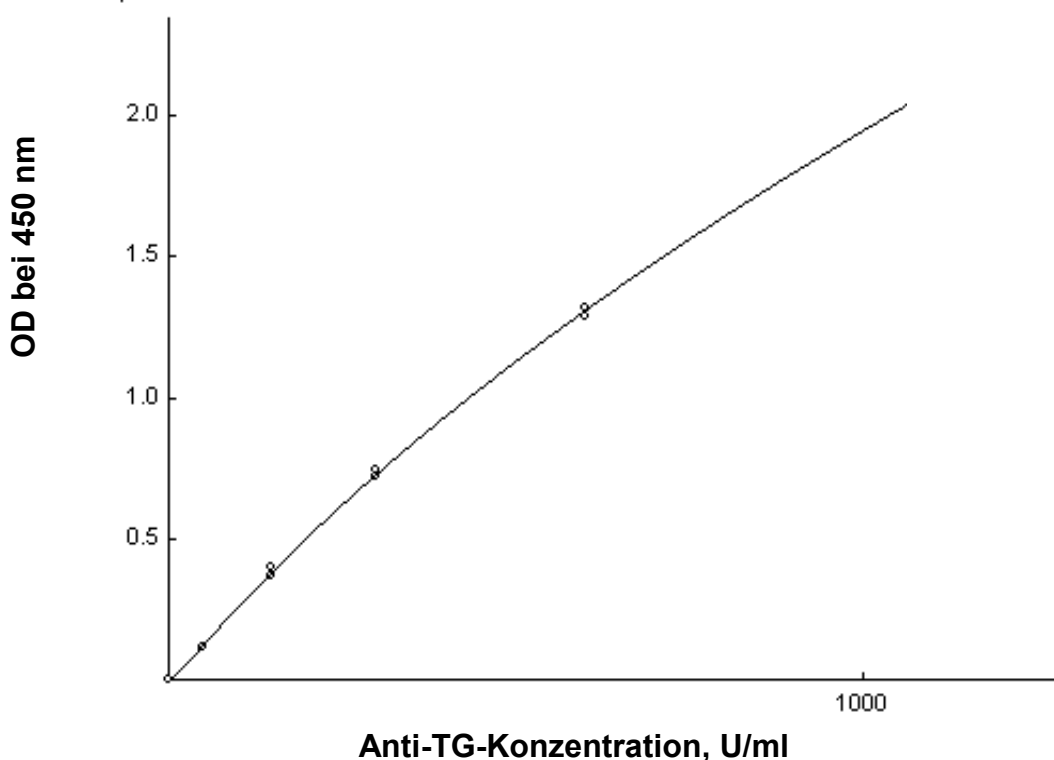


Abb. 2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Testschema

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
	ASSAYB	–	100 µl
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
Inkubation №1	30 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
CONJ	–	120 µl	120 µl
Inkubation №2	30 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №3	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-07 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit aufgereinigtem TG.	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus TG konjugiert mit HRP	17 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Anti-TG Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Anti-TG-Konzentration: 0; 50; 150; 300; 600; 1200 U/ml. Die exakten Anti-TG-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	8 Fläschchen je 0,5 ml: CAL 1, 4 – 2 × 0,5 ml; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Anti-TG Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Anti-TG-Konzentration. Der Anti-TG-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen
ASSAYB	Analysenpuffer	14 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhrchen 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL** **5000X** Trial-Lösung, 5000X konzentriert;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **Anti-TG Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten. Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder entionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Anti-TG-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4. Datenverarbeitung

14.4.1. Datenverarbeitung (OD gemessen bei 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um den möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **Anti-TG kit** is provided for the **quantitative determination of autoantibodies against thyroglobulin (TG) in human serum.**

This test has 2 complete sets:

REF 24-07 for manual use;

REF 24-07 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for analyser

Note 1: *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of the test*

REF 24-07 A *only on analyser “Alisei”,*

REF 24-07 *only for manual use.*

While using a non-predefined method of use it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

Autoantibodies against TG (**Anti-TG**) are mainly IgG and, less frequently, IgA and IgM. Anti-TG concentration in serum of healthy people can reach 65 U/mL. Exceeding this threshold is a symptom of the autoimmune disorder that usually leads to the thyroid gland dysfunction. Quantitative determination of Anti-TG in human serum is useful in autoimmune thyroid diseases diagnostics (Hashimoto thyroiditis, idiopathic myxoedema, Grave's disease).

3. PRINCIPLE OF TEST

The **Anti-TG kit** is provided for the quantitative determination of antibodies to TG that belong to any class of immunoglobulins. During the first incubation anti-TG from calibrators and specimens bind to TG coated onto the inner surface of microwells. During the second incubation antibodies bound to TG react with TG-HRP conjugate. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to the Anti-TG level in the sample (Fig.1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to Anti-TG concentration in specimens. Anti-TG concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

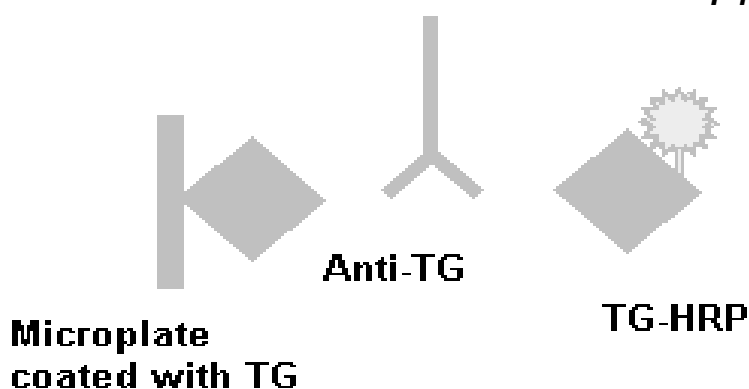


Fig. 1 Assay scheme

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label.

The **Anti-TG kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 12 months. After initial opening, the kit is stable until the expiration date if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C until the expiration date; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution, stop solution and assay buffer: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for no more than 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 120 apparently healthy people (both males and females) at the age 21–45 were assayed with Anti-TG kit. Measured Anti-TG concentrations did not exceed 65 U/mL. This limit should be considered as guideline only.

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of Anti-TG concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

MP Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL CONTROL Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter.

Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically.

Make sure than no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P** **20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature (+18...+25 °C). Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration-Traceability:

The **Anti-TG kit** was calibrated against the WHO 1st International Reference Preparation 65/093.

10.2. Specificity:

High specificity of the assay was ensured by highly purified TG that did not demonstrate any detectable cross-reactivities with autoantibodies to thyroid peroxidase or autoantibodies to TSH receptor.

12

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Anti-TG kit**, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 7.5 U/mL. It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

10.4. Measurement Range:

The **Anti-TG kits** (manual and Alisei kit) were validated for measurement of Anti-TG concentration within the concentration diapason of 7.5 - 1200 U/mL.

10.5. Hook Effect:

For **Anti-TG kit** high dose hook effect was not detected.

10.6. Measurement Units:

In **Anti-TG kit** the concentrations of calibrators are specified in U/mL. To convert into $\mu\text{g/mL}$, divide the concentration in U/mL by 33.3.

10.7. Intra- and Inter-Assay Variation:

For **intra-assay CV** determination, 8 serum samples were run, each in 9 replicate. The results are showed below.

Manual kit

Sample	Mean Anti-TG concentration, U/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	51	3.6	7.1
2	78	4.4	5.6
3	122	5.2	4.3
4	156	7.3	4.7
5	179	5.5	3.1
6	677	27.1	4.0
7	891	31.2	3.5
8	1115	23.4	2.1

Alisei kit

Sample	Mean Anti-TG concentration, U/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	61	3.1	5.1
2	106	3.9	3.7
3	146	5.9	4.0
4	199	7.2	3.6
5	253	8.4	3.3
6	536	14.5	2.7
7	773	20.1	2.6
8	1108	22.9	2.1

For **inter-assay CV determination**, 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are showed below.

Manual kit

Sample	Mean Anti-TG concentration, U/mL			Inter-assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	37	43	32	4.2	9.9
2	61	66	64	3.5	5.4
3	112	121	118	6.7	5.3
4	160	175	188	10.6	6.1
5	357	348	326	6.4	1.8
6	664	701	675	26.2	3.7
7	1086	998	1009	62.2	6.2
8	1172	1063	1103	77.1	7.3

Alisei kit

Sample	Mean Anti-TG concentration, U/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	62	69	72	5.1	7.6
2	104	111	107	3.5	3.3
3	139	159	156	10.8	7.1
4	200	219	210	9.5	4.5
5	232	259	249	13.6	5.5
6	541	543	520	12.7	2.4
7	800	769	782	15.6	2.0
8	1120	1159	1183	31.8	2.7



11. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.



Due to the heterogeneous nature of human autoantibodies there might be samples that do not maintain dilution parallelism.

12. SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 M HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;

- in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time Anti-TG concentration in the control.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
 -  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.
 -  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment. After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage.

Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;
- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

13. MANUAL TEST (REF 24-07)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with purified TG	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing TG conjugated with HRP	14 mL, ready to use
0-5 CAL	Anti-TG calibrators: protein-based solutions or lyophilized preparations containing known Anti-TG concentrations – 0; 50; 150; 300; 600; 1200 U/mL. For exact Anti-TG concentrations see vial labels	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	Anti-TG control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known Anti-TG concentration. For exact range of Anti-TG concentration see vial label	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2 x 14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	14 mL, ready to use
ASSAYB	Assay buffer	14 mL, ready to use

13.2 Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator/shaker (+37 °C, shaking speed 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3 Test Procedure

The **Anti-TG kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (control of OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1 Assay Procedure

(Assay scheme section 13.5)

- A.** Pipette **100 µL assay buffer** **ASSAYB** into each well, **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **50 µL** of **calibrators** **CAL** (0-5), **control** **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells.
- C.** Incubate strips for **30 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**
- D.** Wash 5 times, as described below.
- E.** Pipette **120 µL conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**
- F.** Incubate strips for **30 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**
- G.** Wash 5 times, as described below.
- H.** Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- I.** Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature (+18...+25 °C).**
- J.** Read OD at **450 nm within 20 min.**

13.3.2 Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 μ L of wash solution per well per cycle.

If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 μ L of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;
- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4 Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1 Data Reliability (for OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.0 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the vial label.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2 Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective Anti-TG concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of Anti-TG in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to Anti-TG above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 1200 U/mL) is forbidden.

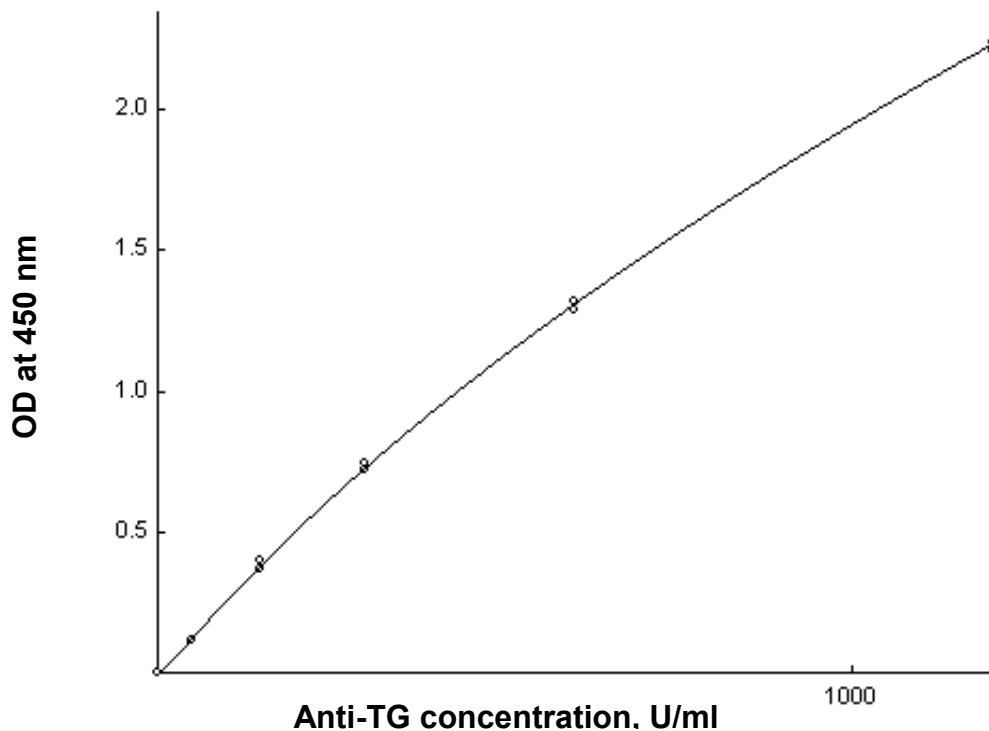


Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5 Assay scheme

Reagents	Wells		CAL	
		«Blank»	CONTROL	Samples
ASSAYB		–	100 µL	100 µL
CAL		–	50 µL	–
CONTROL		–	–	–
Samples		–	–	50 µL
Incubation No.1	30 min, +37 °C, 500–800 rpm			
WASH P (diluted)	5 x 300 µL			
CONJ		–	120 µL	120 µL
Incubation No.2	30 min, +37 °C, 500–800 rpm			
WASH P (diluted)	5 x 300 µL			
SUB		100 µL	100 µL	100 µL
Incubation №3	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark			
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm			
STOP		100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

14 AUTOMATIC TEST (REF 24-07 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with purified TG	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing TG conjugated with HRP	17 mL, ready to use
0-5 CAL	Anti-TG calibrators: protein-based solutions or lyophilized preparations containing known Anti-TG concentrations – 0; 50; 150; 300; 600; 1200 U/mL. For exact Anti-TG concentrations see vial labels	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1, 4 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	Anti-TG control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known Anti-TG concentration. For exact range of Anti-TG concentration see vial label	2 × 0.5 mL, ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order
ASSAYB	Assay buffer	14 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser "Alisei".

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000X concentrated*
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

The **Anti-TG kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL 5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

* Reagents are not included in the kit, they are delivered by separate order.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the procedure analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation Anti-TG concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)

See criteria in section 13.4.1.

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with a kit of any other lot, is not permitted.

-

February, 22, 2018



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0)30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de