

# TG kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung von Thyreoglobulin in humanem Blutserum

*(Gebrauchsanweisung: Seite 3)*

Enzyme immunoassay for quantitative determination of thyroglobulin in human serum



*(Instructions for use: page 29)*

Manueller Test / Manual test















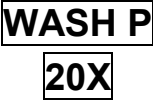









*Abschnitt / Section 13*

Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 14*

				<b>IVD</b>
TG Kit (Manueller Test) TG kit (manual test)		96 Untersuchungen 96 tests	<b>24-08</b>	<b>REF</b>
TG Kit (Automatisierter Test für "Alisei") TG kit (automated test for "Alisei")		96 Untersuchungen 96 tests	<b>24-08 A</b>	<b>REF</b>

## 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
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Probenverdünnungspuffer Sample Diluent
	Kontrolle Control		Optische Dichte Optical density
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Reizend Irritant
		<b>Warning</b>	

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **TG Testkit** wird für die **quantitative Bestimmung** von **Thyreoglobulin (TG) in humanem Blutserum** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 24-08** Für den manuellen Gebrauch;

**REF 24-08 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 Testkits:*

**REF 24-08 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";

**REF 24-08** 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.*

Das Thyreoglobulin (TG) ist das Hauptprotein, welches in der Schilddrüse produziert wird. Es ist Vorstufe und Speicherform der Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3).

TG ist ein iodiertes Glykoprotein mit einer Molekularmasse von 660 kDa, das aus zwei Untereinheiten besteht.

Die TG-Konzentration im Blutserum hängt von der Masse der Schilddrüse, dem Funktionszustand und dem Entzündungsgrad ab.

Bei gesunden Menschen liegt die TG-Konzentration bei 2-50 ng/ml und kann sich während einer Schwangerschaft fast verdoppeln. Nach einer Operation oder einer Therapie mit radioaktivem Iod bleibt die TG-Konzentration im Blut innerhalb einiger Wochen erhöht. Bei Menschen, die in Iod-Mangelgebieten leben, ist die mittlere TG-Konzentration im Blut erhöht. Seit 1994 wird TG seitens der WHO als ein Indikator des endemischen Kropfes betrachtet.

Die TG-Konzentrationsbestimmung im Serum wird zum Monitoring von Patienten mit Schilddrüsenkarzinom eingesetzt. Die Dynamik der TG-Konzentration gilt als Marker bei der Beurteilung des Behandlungserfolges, zur Erkennung möglicher Rezidive oder der Entstehung von Metastasen bei Thyroidektomie. Dieser Parameter wird jedoch nicht für die primäre Diagnostik von Schilddrüsentumoren verwendet.

Die Konzentrationsbestimmung des TG im Blutserum kann auch bei der Differentialdiagnose einer angeborenen Schilddrüsenunterfunktion helfen. Eine erhöhte TG-Konzentration ermöglicht das Unterscheiden einer subakuten Thyreoiditis (TG-Konzentration bleibt erhöht) von einer pharmakologischen Thyreotoxikose. Eine Konzentrationssteigerung des TGs kann auch auf eine Rekurrenz nach Abbruch einer suppressiven Therapie bei Morbus Basedow-Patienten hindeuten.

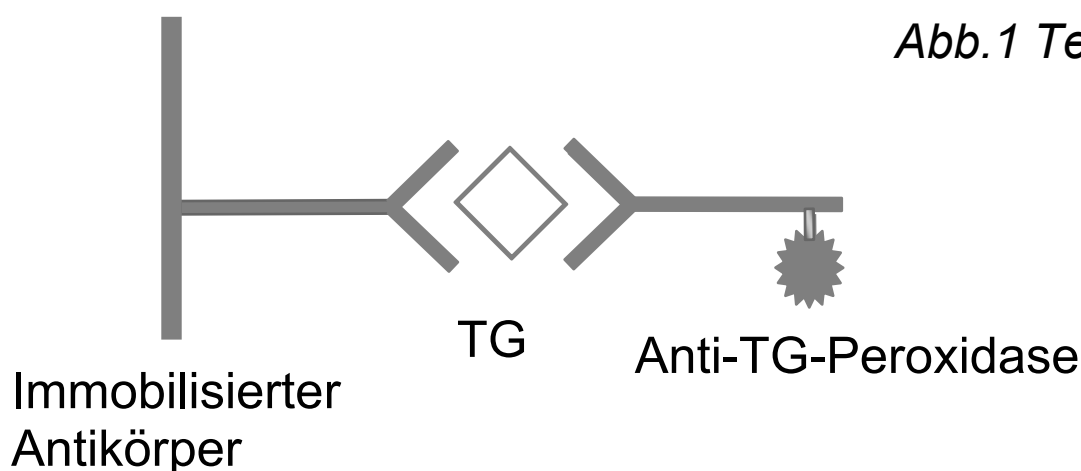
Auf Grund der Anwesenheit von TG-Autoantikörpern im Serum kann die TG-Bestimmung erschwert werden. In diesem Fall können falsch-negative Ergebnisse resultieren. Um verlässliche Testergebnisse zu erhalten, wird empfohlen, die TG-Bestimmung mit einer Anti-TG-Bestimmung zu kombinieren.

Eine serielle TG-Messung beim Patienten-Monitoring sollte stets mit derselben Methode erfolgen. Daher sollten dem behandelnden Arzt sowohl der Laborbefund als auch die Testmethode übermittelt werden. Beim Wechsel der Testmethode muss das Labor den neuen Test klinisch validieren und die Ergebnisse mit einem zweiten Test vergleichen.

### 3. TESTPRINZIP

Der **TG Testkit** ist ein "Sandwich"-Typ des Festphasen-Enzymimmunoassay, basierend auf zwei monoklonalen Antikörpern, die spezifisch an unterschiedliche Epitope des TG-Moleküls binden. Einer dieser Antikörper ist mit der Meerrettich Peroxidase (HRP) konjugiert, der zweite ist an die Innenfläche der Kavität gebunden.

Die TG-Moleküle der Blutserumprobe binden sowohl den immobilisierten Antikörper als auch das Anti-TG-Peroxidase-Konjugat (Abb. 1). Beim Waschen der Kavitäten mit der Waschlösung werden alle ungebundenen Komponenten entfernt. Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur TG-Konzentration der zu testenden Probe.



*Abb.1 Testschema*

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich eine Farbreaktion. Die Intensität der Färbung korreliert mit der TG-Menge der Probe oder des Kalibrators. Die TG-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

#### **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 **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 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C bis zu 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Ablaufdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren, Kontrolle flüssig: bei +2...+8 °C für 12 Monate; Fläschchen mit Kalibrator und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat;

- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösungskonzentrats, Probenverdünnungspuffer und der Stopplösung: 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, für eine Analyse Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämisches (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Proben sind bei der Temperatur von +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  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## 6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **TG Testkits** wurden Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr bei 223 gesunden 21-45-Jährigen (beider Geschlechter) entnommen wurden, untersucht. Die ermittelte TG-Konzentration lag bei 99,1% der Patienten unter 55 ng/ml.

Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe. Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die 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** Mikrotiterplatte

Die Verpackung der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:



. 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 Wasser wird jeweils in die Flaschen der lyophilisierten Kalibratoren und Kontrolle pipettiert, diese wieder mit jeweiligem Deckel verschlossen und bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) 10 Minuten 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 Waschlösung**

Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem Wasser:

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

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

**SUB Substrat** vor direktem Licht schützen.

## 9. PROBENVORBEREITUNG

Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

Sollte die zu erwartende TG-Konzentration der Proben höher als die Konzentration im Kalibrator 5 sein, werden die Proben (sowohl beim manuellen Gebrauch als auch beim automatisierten Test entsprechend der jeweiligen Gebrauchsanweisung) vorab mit dem Probenverdünnungspuffer **DIL** 50fach verdünnt.

490 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Serumprobe  
Vortexen und gründlich mischen.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1 Kalibrierung:

Der **TG Testkit** wurde gegen das internationale, zertifizierte Referenzmaterial Thyreoglobulin CRM 457 (*Community Bureau of References, BCR, Brüssel, Belgien*) kalibriert.

### 10.2 Spezifität:

Es wurde keine Kreuzreaktion zwischen monoklonalen Antikörpern und AFP, FSH, TBG, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> nachgewiesen.

Einen Einfluss spezifischer (TG-Autoantikörper) oder unspezifischer Serumfaktoren auf das Analyseergebnis kann jedoch nicht prinzipiell ausgeschlossen werden.

### 10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **TG Testkits**, d.h. die minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher

unterscheiden lässt, beträgt 1,0 ng/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (+2 SD) gebildet.

#### 10.4 Messbereich:

Der **TG Testkit** (Manuelles Testkit und Alisei Testkit) ist validiert für die Detektion einer TG-Konzentration innerhalb eines Bereiches von 1,0 bis 300 ng/ml (ohne Verdünnung).

#### 10.5 Hook Effekt:

Für den **TG Testkit** konnte ein High-Dose-Hook-Effekt bei Konzentrationen bis 30 000 ng/ml nicht beobachtet werden. Der High-Dose-Hook-Effekt wurde durch Aufstocken des Kalibrators 0 mit Antigen bestimmt.

#### 10.6 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

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

##### Manuelles Testkit

Probe	Mittlere TG-Konzentration, ng/ml	Intra-assay Varianz	
		SD	VK, %
1	1,6	0,12	7,5
2	5,0	0,12	2,4
3	10,0	0,26	2,6
4	20,4	0,64	3,1
5	34,6	0,76	2,2
6	37,1	1,47	4,0
7	48,3	1,30	2,7
8	228	6,6	2,9

##### Alisei Testkit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	2,0	0,11	5,5
2	7,5	0,38	5,0
3	12,8	0,56	4,3
4	21,6	1,21	5,6
5	35,1	1,90	5,4
6	85,9	2,52	2,9
7	143,9	2,93	2,0
8	268,2	5,87	2,2

Um einen **inter-assay** Variationskoeffizient festzulegen, wurden 8 Blutserumproben drei Mal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

#### Manuelles Testkit

Probe	Mittlere TG-Konzentration, ng/ml			Inter-assay Präzision	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,11	1,51	1,36	0,200	14,1
2	2,02	2,45	2,06	0,240	10,5
3	6,46	5,96	6,92	0,480	7,5
4	13,0	12,3	12,8	0,36	2,9
5	38,8	38,9	41,6	1,59	3,9
6	47,8	46	50,2	2,11	4,4
7	111	128	140	14,6	10,9
8	286	275	273	7,0	2,6

## Alisei Testkit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	2,0	2,3	2,1	0,15	7,2
2	7,5	7,0	7,9	0,45	6,0
3	12,8	14,3	15,0	1,12	8,0
4	21,6	19,4	19,0	1,40	7,0
5	35,1	39,6	37,8	2,26	6,0
6	85,9	79,1	89,5	5,28	6,2
7	143,9	159,7	155,5	8,18	5,3
8	268,2	257,9	280,6	11,37	4,2

## 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.

Da die Präsenz von Anti-TG-Antikörper im Serum die Ergebnisse der TG-Bestimmung beeinflussen und zu den falsch-negativen Resultaten führen kann, wird empfohlen, immer die Bestimmung von TG und Anti-TG-Autoantikörper zu kombinieren.

Bei seriellen Untersuchungen zum Monitoring eines Patienten sollte immer die gleiche Methode verwendet werden. Gemeinsam mit den Messergebnissen sollten dem behandelnden Arzt auch die Information über die Testmethode mitgeteilt werden. Beim Wechsel einer Methode muss das Labor eine geeignete klinische Überprüfung durchführen und die Testergebnisse von zwei Testkits vergleichen.

## 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 TMB-, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- TMB-, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N 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 TG-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- 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**, **DIL**, **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 24-08)

### 13.1.Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-TG-Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus monoklonalen Anti-TG-Antikörper und Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5</b> <b>CAL</b>	<b>TG Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierten TG-Konzentration- 0; 3; 10; 30; 100; 300 ng/ml/ (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen TG-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen mit je 0,5 ml, gebrauchsfertig
<b>CONTROL</b>	<b>TG Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter TG-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische TG-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig
<b>WASH P</b> <b>20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2x14 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-	14 ml, gebrauchsfertig

	Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
<b>DIL</b>	<b>Probenverdünnungspuffer:</b> Protein-Puffer	3,0 ml, gebrauchsfertig
	<b>Klebeschutzfolie</b>	2x1 Folie (optional)

### 13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

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

## 13.3 TESTABLAUF

Der **TG Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Leerwertes (Blank = OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1. Assay-Durchführung

**Anmerkung:** Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

#### Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1,  
Abschnitt 13.5)

**Anmerkung:** Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

**Alle Proben müssen in Doppelbestimmung getestet werden.**

- A. 100 µl Konjugat [CONJ]** in alle Kavitäten pipettieren.  
**Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank).**
- B. 50 µl der Kalibratoren [CAL], Kontrolle [CONTROL]** und die vorbereiteten **Serumproben** in Zweifachbestimmung in

entsprechende Kavitäten **außer** Kavitäten **A1-A2** (Blank), pipettieren.

**Anmerkung:** *Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.*

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.*

**C. 60 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.

**Anmerkung:** *Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.*

**D.** 5x, wie unten beschrieben, waschen.

**E. 100 µl Substrat** **SUB** in jede Kavität pipettieren. Streifen **entweder bei Raumtemperatur** (+18...+25 °C) **im Dunkeln** für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

**F. 100 µl Stopplösung** **STOP** in **alle Kavitäten** (auch Blank) (in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat) pipettieren und für **1-2 Minuten** bei **Raumtemperatur schütteln**.

**G.** Messen die Optische 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 verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

### 13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher 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 =  $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$ .

#### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

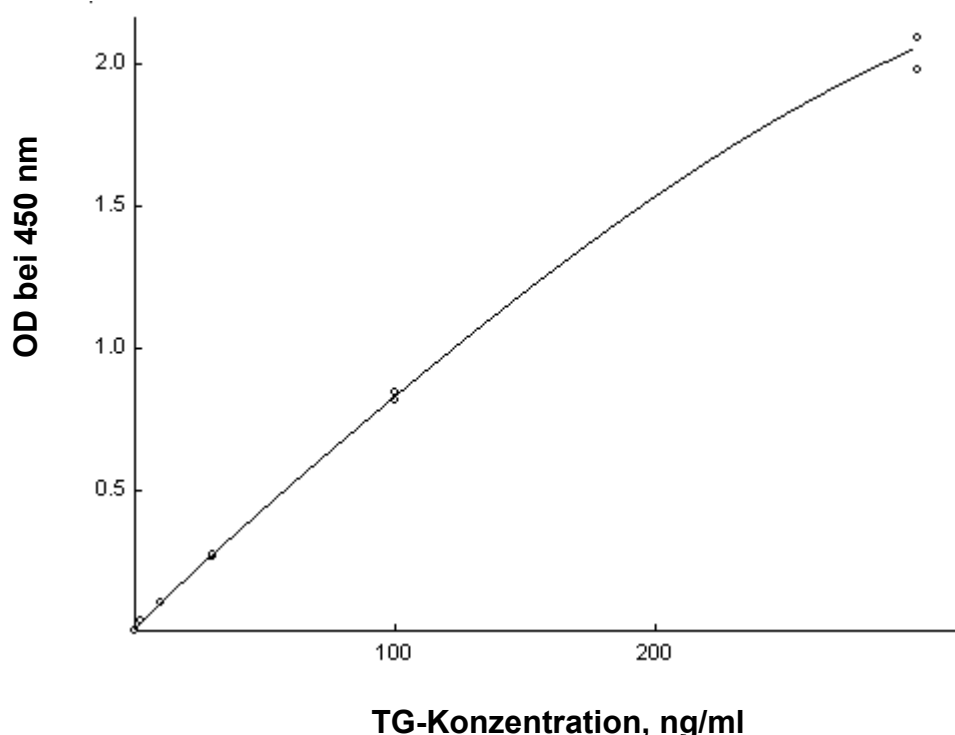
- Mittelwert der OD des Blank (der Kavität A1-A2)  $\leq 0,100$
- Mittelwert der OD des Kalibrator 5  $\geq 1,500$  (nach Blank Subtraktion)

- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet 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 TG-Konzentration mittels **4PL** oder **5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die TG-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.



*Abb. 2 Typische Standardkurve*

***Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen***

Eine Extrapolation der Standardkurve für TG-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten, ist nicht zulässig. In diesem Fall sollte die Probe 50fach mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Die gemessene Konzentration der vorverdünnten Probe muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (50x) multipliziert werden.



### 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität	«Blank»	<b>CAL</b>	Proben
		<b>CONTROL</b>	
Reagenzien			
<b>CONJ</b>	–	100 µl	100 µl
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
Inkubation №1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	5 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №2	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-08 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti- TG-Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus monoklonalen Anti-TG-Antikörpern konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (HRP).	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>TG Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter TG-Konzentration – 0; 3; 10; 30; 100; 300 ng/ml. (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische TG-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen, je 0,5 ml <b>CAL</b> 1,4- 2×0,5 ml; <b>CAL</b> 0,2,3,5- 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTR OL</b>	<b>TG Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter TG-Konzentration. Der TG-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>DIL</b>	<b>Probenverdünnungspuffer:</b> Protein-Puffer	3 ml, gebrauchsfertig
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden.

**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 Röhren 12 x 75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

## 14.3 Testverfahren

Der **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 deionisiertem Wasser:

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

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

\* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.

### **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 TG-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Datenverlässlichkeit (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 aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen 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 **TG** kit is provided for the quantitative determination of thyroglobulin (TG) in human serum.

This test has 2 complete sets:

**REF 24-08** for manual use,

**REF 24-08 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:

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 test:*

**REF 24-08 A** only on analyser "Alisei",

**REF 24-08** only for manual use.

*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

Thyroglobulin (TG) is the main protein produced by thyroid gland. It is the precursor and the deposit form of thyroid hormones thyroxin ( $T_4$ ) and triiodothyronine ( $T_3$ ). TG is an iodinated glycoprotein with a molecular mass of 660 KDa that consists of two subunits.

TG concentration in serum depends on mass of thyroid gland, its functional status and degree of inflammation.

In healthy people TG concentration varies from 2 to 50 ng/mL and may increase about twofold during the pregnancy.

After surgical operation or treatment with radioactive iodine TG concentration remains increased for several weeks. In the population suffering from environmental iodine deficiency mean TG concentration in blood is increased. Since 1994 TG has been regarded by WHO as one of the indicators of endemic goiter.

Serum TG measurement is performed mostly for monitoring of thyroid carcinoma patients. Dynamics of TG concentration is used as a marker for evaluation of treatment efficiency, revealing of possible recurrence and metastases in patients after thyrectomia. This parameter is not used for primary diagnostics of thyroid cancer.

TG concentration in serum may be useful for exact diagnostics in the case of congenital hypothyrosis. Increased TG concentration permits to differentiate subacute thyroiditis from pharmacological thyrotoxicosis (when TG level remains stable). At patients with Grave's disease increase in TG concentration forewarns of recurrence after canceling suppressive therapy.

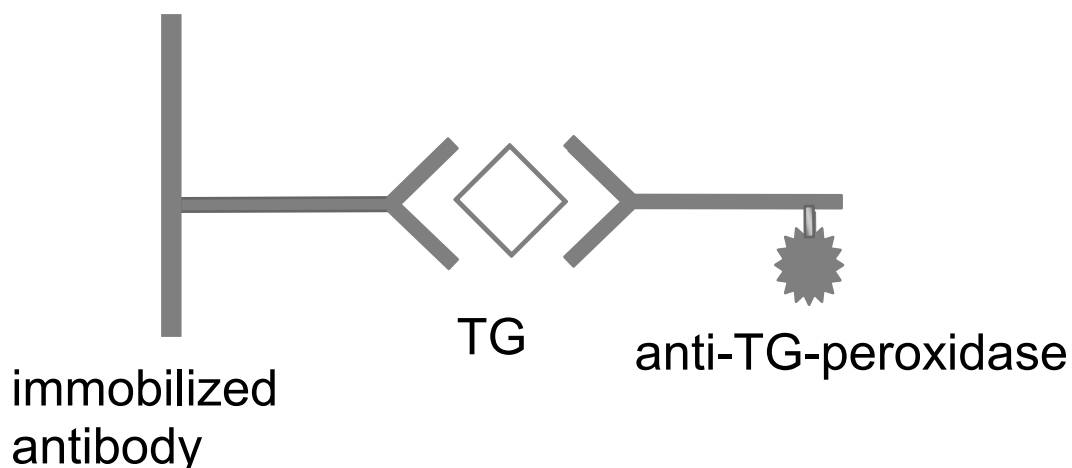
TG measurement can be distorted by presence of anti-TG autoantibodies in the serum sample. In this case the results may be false-negative. To obtain the reliable results it is recommended always to combine TG and anti-TG autoantibodies determination.

Serial TG determinations for patient's monitoring should be always done by the same method. The physician should be always informed not only of the results of TG determination but also of the type of assay used. When the type of diagnostic kit is changed, the laboratory must perform the appropriate clinical evaluation and compare the range of the results obtained with two types of kits.

### 3. PRINCIPLE OF TEST

The **TG kit** is a “sandwich” type of solid-phase enzyme immunoassay, based on two monoclonal antibodies that are specific for different epitopes of TG molecule. One of these antibodies is conjugated with horseradish peroxidase (HRP); the other is coated onto the inner surface of microwells. TG molecules from the serum sample bind to both immobilized antibody and anti-TG-peroxidase conjugate (Fig. 1). Then the wells are washed with wash solution to remove any material not bound to the inner surface of the wells. Quantity of the bound conjugate is directly proportional to the TG level in sample.

During incubation with substrate the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to the concentration of TG in specimens or calibrators. 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 **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 18 months. After initial opening the kit is stable for 12 months if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- 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 for no more than 12 months after opening; 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, sample diluent, stop solution : 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 longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

## **6. EXPECTED VALUES**

TG concentrations range determined with **TG kit** in serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 223 apparently healthy people (both males and females) at the age of 21–45 did not exceed 55 ng/mL in 99.1% of cases. These limits should be considered as guidelines only.

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

## **7. QUALITY CONTROL**

It is recommended to use control samples according to 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** Microplate

Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips into strip holder. Place unused strips onto 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 (+18...+25 °C) 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 that 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.

If expected TG concentration in the samples is higher than in **calibrator 5**, the samples should be diluted 50-fold with sample diluent **DIL** in concordance with instructions for use for analyser “Alisei” or manually test before analysis.

The example of manual sample dilution as follows:  
490 µL sample diluent **DIL** + 10 µL serum sample  
vortex or mix thoroughly

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### 10.1. Calibration – Traceability:

The **TG kit** was calibrated against the International TG Reference Material CRM 457 (*Community Bureau of references, BCR, Brussels, Belgium*).

### 10.2. Specificity:

For the monoclonal antibodies used in the assay, no detectable cross-reactivities were found with the following substances: AFP, FSH, TBG, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>.

Nevertheless, the falsification of any TG determination by specific (e.g. anti-TG antibodies) or non-specific serum factors can not in principle be excluded.

### 10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of manual and Alisei **TG assay**, or the lowest detectable concentration that can be distinguished from zero calibrator, is 1.0 ng/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two standard deviations.

#### 10.4. Measurement Range:

The **TG kits (manual and Alisei kit)** were validated for measurement of TG concentration within the concentration diapason (without dilution) of 1.0 - 300 ng/mL.

#### 10.5 Hook Effect:

For **TG kit** high dose hook effect was not detected for concentrations up to 30 000 ng/mL. High dose hook effect was determined by spiking calibrator 0 with antigen.

#### 10.6 Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For **inter-assay CV** determination 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

##### Manual kit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	1.6	0.12	7.5
2	5.0	0.12	2.4
3	10.0	0.26	2.6
4	20.4	0.64	3.1
5	34.6	0.76	2.2
6	37.1	1.47	4.0
7	48.3	1.30	2.7
8	228	6.6	2.9

##### Alisei kit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	2.0	0.11	5.5
2	7.5	0.38	5.0
3	12.8	0.56	4.3
4	21.6	1.21	5.6

5	35.1	1.90	5.4
6	85.9	2.52	2.9
7	143.9	2.93	2.0
8	268.2	5.87	2.2

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

#### Manual kit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	1.11	1.51	1.36	0.200	14.1
2	2.02	2.45	2.06	0.240	10.5
3	6.46	5.96	6.92	0.480	7.5
4	13.0	12.3	12.8	0.36	2.9
5	38.8	38.9	41.6	1.59	3.9
6	47.8	46	50.2	2.11	4.4
7	111	128	140	14,6	10.9
8	286	275	273	7.0	2.6

#### Alisei kit

Sample	Mean TG concentration, ng/mL			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	2.0	2.3	2.1	0.15	7.2
2	7.5	7.0	7.9	0.45	6.0
3	12.8	14.3	15.0	1.12	8.0
4	21.6	19.4	19.0	1.40	7.0
5	35.1	39.6	37.8	2.26	6.0
6	85.9	79.1	89.5	5.28	6.2
7	143.9	159.7	155.5	8.18	5.3
8	268.2	257.9	280.6	11.37	4.2

## 11. LIMITATION OF THE METHOD




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

TG measurement may be affected by presence of anti-TG autoantibodies in the serum sample. In this case the results may be false-negative. To obtain the reliable results it is recommended always to combine TG and anti-TG autoantibodies determination.


Serial TG determinations for patient monitoring should be always done by the same method. The physician should be always informed not only of the results of TG determination but also of the type of assay used. When the type of diagnostic kit is changed, the laboratory must perform the appropriate clinical evaluation and compare the range of the results obtained with two types of kits.

## 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 N 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 TG concentration in the control.
- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- 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**, **DIL**, **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 24-08)

### 13.1. Material Provided

<p><b>MP</b></p>	<p><b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-TG monoclonal antibodies</p>	<p>1 pcs</p>
<p><b>CONJ</b></p>	<p><b>Conjugate:</b> solution contains anti-TG monoclonal antibodies conjugated with HRP</p>	<p>14 mL, ready to use</p>
<p><b>0-5 CAL</b></p>	<p><b>TG calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known TG concentrations - 0; 3; 10; 30; 100; 300 ng/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific TG concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.</p>	<p>6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized</p>
<p><b>CONTROL</b></p>	<p><b>TG control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known TG concentration The range of TG concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of TG concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.</p>	<p>0.5 mL, ready to use or lyophilized</p>
<p><b>WASH P 20X</b></p>	<p><b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution</p>	<p>2x14 mL, concentrated</p>
<p><b>SUB</b></p>	<p><b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide</p>	<p>14 mL, ready to use</p>

<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
<b>DIL</b>	<b>Sample diluent:</b> protein-based solution	3.0 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

### 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 (+37 °C) or 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 **TG kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 13.3.1. Assay Procedure

**Note:** *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

#### Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

**Note:** *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

*All samples should be tested in duplicates.*

- A.** Pipette **100 µL conjugate** **CONJ** into each well, **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **50 µL of calibrators** **CAL**, **control** **CONTROL** and prepared **patient's samples** in duplicates; **except wells A1-A2.**

**Note:** *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

**Note:** *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

- C.** Incubate for **60 minutes at +37 °C while shaking (500–800 rpm)**.

**Note:** *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

- D.** Wash 5 times, as described below.

- E.** Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate strips **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**.

- F.** Pipette **100 µL stop solution** **STOP** to all the wells in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature**.

- G.** 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 µL of wash solution per well per cycle. If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL 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:

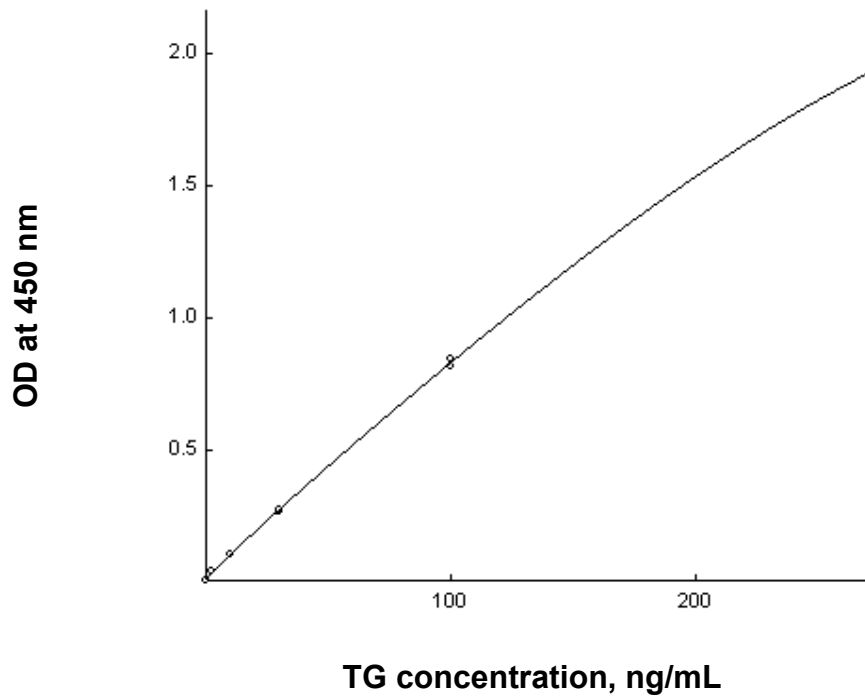
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 5  $\geq 1.500$  (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that are shown on the Quality Control Sheet.

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 values of the calibrators at 450 nm versus their respective TG concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of TG in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to TG concentration above the nominal value of calibrator 5 is forbidden. In this case the sample should be diluted 50-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of pre-diluted samples by dilution factor (50-fold).



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

### 13.5. Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
<b>CONJ</b>	–	100 µL	100 µL
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation №1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (diluted)	5 x 300 µL		
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation №2	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		



## 14. AUTOMATIC TEST (REF 24-08 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-TG monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution contains anti-TG monoclonal antibodies conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>TG calibrators:</b> protein-based solution or lyophilized preparations containing known TG concentrations - 0; 3; 10; 30; 100; 300 ng/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific TG concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each: <b>CAL</b> 1, 4 – 2 × 0.5 mL; <b>CAL</b> 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>TG control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known TG concentration. For lot specific ranges of TG concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50mL, concentrated
<b>DIL</b>	<b>Sample diluent:</b> protein-based solution	3.0 mL, ready to use
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order

**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 **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:

---

\* Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

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

Mix thoroughly, avoid foaming.

### **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 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.

August 26, 2019



Astra Biotech GmbH  
Rudower Chaussee 29  
12489 Berlin, Germany  
Telefon: +49 (0)30 74696509

E-Mail: [info@astrabiotech.de](mailto:info@astrabiotech.de)  
[www.astrabiotech.de](http://www.astrabiotech.de)