



User's Manual



Thyroglobulin ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of thyroglobulin (hTG) in serum or plasma



EIA-3377



96 wells



DRG 

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg
Telefon: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49-(0)6421-1700 50
Internet: www.drg-diagnostics.de
E-Mail: drg@drg-diagnostics.de

DRG 

DRG International, Inc.
USA
Telephone: (908) 233-2079
Fax: (908) 233-0758
E-Mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.**

Table of Contents / Tabella die Contenuti

1	NAME AND INTENDED USE	2
2	SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST	2
3	PRINCIPLE OF THE TEST	2
4	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	2
5	CONTENTS OF THE KIT	3
6	STORAGE AND STABILITY	3
7	MATERIALS REQUIRED.....	4
8	SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING	4
9	PROCEDURAL NOTES.....	4
10	PREPARATION OF REAGENTS	5
11	TEST PROCEDURE.....	5
12	INTERPRETATION OF RESULTS	7
13	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
14	LIMITATIONS OF PROCEDURE	8
15	INTERFERING SUBSTANCES	8
16	REFERENCES.....	9
1	CONTENUTO DEL KIT.....	10
2	AVVERTENZE E PRECAUZIONI.....	10
3	CONSERVAZIONE E STABILITÀ	10
4	MATERIALE NECESSARIO	11
5	RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI	11
6	AVVERTENZE OPERATIVE	11
7	PREPARAZIONE DEI REAGENTI	12
8	ESECUZIONE DEL TEST	12
9	INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI.....	13
10	PRESTAZIONI DEL KIT	13
	SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS.....	14

1 NAME AND INTENDED USE

Thyroglobulin is an indirect solid phase enzyme immunoassay (ELISA) for the quantitative measurement of thyroglobulin in human serum. The assay is intended for in vitro diagnostic use only as an aid in the diagnosis of various thyroid diseases such as thyroiditis and hyperthyroidism.

2 SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Thyroglobulin (hTG) is a multiple glycosylated, water soluble iodoprotein. The molecular weight of approx. 660.000 Dalton is shared by two identical subunits. Thyroglobulin is synthesized in the thyrocytes of the thyroid gland and secreted into the lumen of the thyroid follicles. Iodination of the proteins tyrosyl residues lead to the precursors of the thyroid hormones T3 and T4. Finally the free T3 and free T4 are liberated into circulation, together with small amounts of thyroglobulin. Like for T3 and T4, synthesis and secretion of thyroglobulin is controlled by TSH and TRH. Suppressive medication using the thyroid hormones also leads to lower thyroglobulin serum concentration.

Elevated thyroglobulin serum concentrations have been reported in various thyroid diseases, such as

- hyperthyroidism
- non-toxic goiter
- thyroiditis
- differentiated thyroid carcinoma

Determination of thyroglobulin is a special prognostic value in Graves` disease patients undergoing therapy. Highly elevated hTG values at the end of a thyrostatic therapy are indicative for an early recidivation, whereas for patients with continuous low thyroglobulin concentrations prognosis tends to continual recovery.

A main application for the thyroglobulin determination is the post surgical monitoring of patients with differentiated thyroid carcinoma. After thyroidectomy, combined with x-ray therapy to destroy remaining thyroid tissue, one can expect an intermediate peak followed by a fast decrease of circulating thyroglobulin concentrations below the detection limit. Each renewed increase of serum thyroglobulin is indicative for residual thyroid tissue, a local recidivation of metastases.

Due to its easy repeatability in the routine monitoring of thyroid carcinoma patients, the determination of thyroglobulin is a valueable non-invasive alternative and supplement to ¹³¹I-scintigraphy

3 PRINCIPLE OF THE TEST

Highly specific anti-human-thyroglobulin antibodies are bound to microwells. Thyroglobulin, if present in diluted serum or plasma, binds to the respective antigen. Washing of the micro-wells removes unspecific serum and plasma components. Horseradish peroxidase (HRP) conjugated anti-human-thyroglobulin antibodies immunologically detects the bound patient thyroglobulin forming a antibody/thyroglobulin/conjugate complex. Washing of the microwells removes unbound conjugate. An enzyme substrate in the presence of bound conjugate hydrolyzes to form a blue color. The addition of an acid stops the reaction forming a yellow end-product. The intensity of this yellow color is measured photometrically at 450 nm. The amount of colour is directly proportional to the concentration of thyroglobulin present in the original sample.

4 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. All reagents of this kit are strictly intended for in vitro diagnostic use only.
2. Do not interchange kit components from different lots.
3. Components containing human serum were tested and found negative for HBsAg, HCV, HIV1 and HIV2 by FDA approved methods. No test can guarantee the absence of HBsAg, HCV, HIV1 or HIV2, and so all human serum based reagents in this kit must be handled as though capable of transmitting infection.
4. Avoid contact with the TMB (3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidine). If TMB comes into contact with skin, wash thoroughly with water and soap.
5. Avoid contact with the Stop Solution which is acid. If it comes into contact with skin, wash thoroughly with water and seek medical attention.
6. Some kit components (i.e. Controls, Sample buffer and Buffered Wash Solution) contain Sodium Azide as preservative. Sodium Azide (NaN₃) is highly toxic and reactive in pure form. At the product concentrations (0.09%), though not hazardous. Despite the classification as non-hazardous, we strongly recommend using prudent laboratory practices (see 8., 9., 10.).

7. Some kit components contain Proclin 300 as preservative. When disposing reagents containing Proclin 300, flush drains with copious amounts of water to dilute the components below active levels.
8. Wear disposable gloves while handling specimens or kit reagents and wash hands thoroughly afterwards.
9. Do not pipette by mouth.
10. Do not eat, drink, smoke or apply makeup in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Avoid contact between the buffered Peroxide Solution and easily oxidized materials; extreme temperature may initiate spontaneous combustion.

Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera. During handling of all kit reagents, controls and serum samples observe the existing legal regulations.

5 CONTENTS OF THE KIT

Package size 96 determinations

Qty. 1	Divisible microplate consisting of 12 modules of 8 wells each, coated with highly specific anti-human-thyroglobulin antibodies (polyclonal, rabbit). Ready to use.
6 vials, 1.5 ml each	Thyroglobulin calibrators (A-F) in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN ₃ <0.1% (w/w)) containing: 0;3; 10;30; 100; 300 ng/ml. Ready to use.
2 vials, 1,5 ml each	Thyroglobulin Controls in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN ₃ <0.1% (w/w)) elevated (1) and normal (2), for the respective concentrations see the enclosed Quality Control Certificate. Ready to use.
1 vial, 3 ml	Thyroglobulin recovery control in a serum/buffer matrix (PBS, BSA, NaN ₃ <0.1% (w/w)) containing 50 ng/ml human thyroglobulin. Ready to use.
1 vial, 15 ml	Sample buffer (Tris, NaN ₃ <0.1% (w/w)), yellow, Ready to use.
1 vial, 15 ml	Enzyme conjugate solution (PBS, Proclin 300 <0.5% (v/v)), (light red) containing polyclonal rabbit anti-human-thyroglobulin; labelled with horseradish peroxidase. Ready to use.
1 vial, 15 ml	TMB substrate solution. Ready to use.
1 vial, 15 ml	Stop solution (contains acid). Ready to use.
1 vial, 20 ml ^	Wash solution (PBS, NaN ₃ <0.1% (w/w)), concentrate (50x).

6 STORAGE AND STABILITY

1. Store the kit at 2-8 °C.
2. Keep microplate wells sealed in a dry bag with desiccants.
3. The reagents are stable until expiration of the kit.
4. Do not expose test reagents to heat, sun or strong light during storage and usage.
5. Diluted sample buffer and wash buffer are stable for at least 30 days when stored at 2-8 °C.

7 MATERIALS REQUIRED

Equipment

- Microplate reader capable of endpoint measurements at 450 nm
- Multi-Channel Dispenser or repeatable pipet for 100 µl
- Vortex mixer
- Pipets for 10 µl, 100 µl and 1000 µl
- Laboratory timing device
- Data reduction software

Preparation of reagents

- Distilled or deionized water
- Graduated cylinder for 100 and 1000 ml
- Plastic container for storage of the wash solution

8 SPECIMEN COLLECTION, STORAGE AND HANDLING

1. Collect whole blood specimens using acceptable medical techniques to avoid hemolysis.
2. Allow blood to clot and separate the serum by centrifugation.
3. Test serum should be clear and non-hemolyzed. Contamination by hemolysis or lipemia is best avoided, but does not interfere with this assay.
4. Specimens may be refrigerated at 2-8 °C for up to five days or stored at -20 °C up to six months.
5. Avoid repetitive freezing and thawing of serum samples. This may result in variable loss of autoantibody activity.
6. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

9 PROCEDURAL NOTES

1. Do not use kit components beyond their expiration dates.
2. Do not interchange kit components from different lots.
3. All materials must be at room temperature (20-28 °C).
4. Have all reagents and samples ready before start of the assay. Once started, the test must be performed without interruption to get the most reliable and consistent results.
5. Perform the assay steps only in the order indicated.
6. Always use fresh sample dilutions.
7. Pipette all reagents and samples into the bottom of the wells.
8. To avoid carryover contamination change the tip between samples and different kit controls.
9. It is important to wash microwells thoroughly and remove the last droplets of wash buffer to achieve best results.
10. All incubation steps must be accurately timed.
11. Control sera or pools should routinely be assayed as unknowns to check performance of the reagents and the assay.
12. Do not re-use microplate wells.

For all controls, the respective concentrations are provided on the labels of each vial. Using these concentrations a calibration curve may be calculated to read off the patient results semi-quantitatively.

10 PREPARATION OF REAGENTS

10.1 Preparation of wash solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled or deionized water to a final volume of 1000 ml prior to use.

Store refrigerated: stable at 2-8 °C for at least 30 days after preparation or until the expiration date printed on the label.

11 TEST PROCEDURE

11.1 Recovery Test

The presence of autoantibodies against thyroglobulin (anti-TG) can interfere with the determination of thyroglobulin in serum.

Six immunogenic epitopes are present on the surface of the thyroglobulin molecule to which antibodies with different binding characteristics can attach. Autoantibodies against these epitopes will cause false negative results by binding endogenous thyroglobulin. Therefore, it is necessary to prove the presence of autoantibodies in patient samples. This can be done either by direct quantitative measurement with an anti-TG test or indirectly by recovery experiments in combination with the quantitative thyroglobulin determination. For this determination, exogenous TG with a defined concentration is added to the patient sample. Recovery of the exogenous TG can be calculated and provides evidence as to the presence of autoantibodies. This measurement provides a correlation of recovery values to the concentration of autoantibodies present. However, neither the correct antibody content nor the exact thyroglobulin concentration in presence of antibodies can be calculated with this measurement.

For the recovery test, samples have to be determined twice, directly and spiked with thyroglobulin. The percentage recovery is calculated according to the formula below:

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{ng/ml hTG (with recovery control)}}{\text{ng/ml hTG (without recovery control)} + 50 \text{ ng/ml}} \times 100$$

Note: the recovery control contains 50 ng/ml human thyroglobulin.

Recovery should be expected in the range of 80-120 %. If percentage of thyroglobulin recovery is below or above this range, thyroglobulin values for the respective patient sample should be excluded for further assessment.

11.2 Procedure

1. Prepare a sufficient number of microplate modules to accommodate calibrators, controls and undiluted patient samples (P..) and for the recovery test spiked patient samples (R..) (see paragraph *Recovery Test*) in duplicates.

	1	2	3	4	5	6
A	SA	SE	P1	P3		
B	SA	SE	P1	P3		
C	SB	SF	R1	R3		
D	SB	SF	R1	R3		
E	SC	C1	P2	...		
F	SC	C1	P2	...		
G	SD	C2	R2	...		
H	SD	C2	R2	...		

SA - SF: standards A to F
P1, P2... patient sample 1, 2 ...
R1, R2... spiked patient sample 1, 2 ...
C1: positive control
C2: negative control

2. Pipet **50 µl** of calibrators, controls and patient samples into the wells.
3. Add **50 µl sample buffer** to the calibrators, controls and patient samples (P1, P2. ..) resp. **50 µl thyroglobulin recovery control** to the patient wells (R1, R2, ..) into the wells.
4. Incubate for 60 minutes at room temperature (20 - 28 °C).
5. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with **300 µl** of wash solution.
6. Dispense **100 µl** of enzyme conjugate into each well.
7. Incubate for 60 minutes at room temperature.
8. Discard the contents of the microwells and wash 3 times with **300 µl** of wash solution.
9. Dispense **100 µl** of TMB substrate solution into each well.
10. Incubate for 15 minutes at room temperature.
11. Add **100 µl** of stop solution to each well of the modules and let it stand for 5 minutes.
12. Read the optical density at 450 nm and calculate the results. Bi-chromatic measurement with a reference at 600 - 690 nm is recommended.
The developed color is stable for at least 30 minutes. Read optical densities during this time.

Automation

The Thyroglobulin ELISA is suitable for use on open automated ELISA processors. The test procedure detailed above is appropriate for use with or without automation.

12 INTERPRETATION OF RESULTS

12.1 Quality Control

This test is only valid if the optical density at 450 nm for elevated Control (1) and normal Control (2) as well as for the Calibrator A and F complies with the respective range indicated on the Quality Control Certificate enclosed to each test kit ! If any of these criteria is not fulfilled, the results are invalid and the test should be repeated.

12.2 Calculation of results

For the thyroglobulin test a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice.

Recommended Lin-Log Plot

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

12.3 Calculation example

The figures below show typical test results for Thyroglobulin. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Calibrators									
No	Position	OD 1	OD 2	Mean	Conc. 1	Conc. 2	Mean	decl.Conc.	CV %
STA	A 1/B 1	0.065	0.062	0.063	0.4	0.2	0.3	0	4
STB	C 1/D 1	0.117	0.111	0.114	2.8	2.5	2.6	3	4
STC	E 1/F 1	0.221	0.209	0.215	10	9	10	10	4
STD	G 1/H 1	0.421	0.451	0.436	29	32	31	30	5
STE	A 2/B 2	0.930	0.933	0.932	102	102	102	100	0
STF	C 2/D 2	1.759	1.780	1.769	298	304	301	300	1

12.4 Interpretation of results

In the literature cut-off values for serum thyroglobulin of around 60 ng/ml, with a median of 5 to 10 ng/ml are reported. In newborn babies as well as in pregnant woman of the 3rd trimester higher thyroglobulin concentrations may be detected. For comprehensive interpretation of thyroglobulin concentrations knowledge of alimentary iodine supply is indispensable. In regions with endemic goiter hTG values tend to be higher.

Using the thyroglobulin test kit, in healthy blood donors a normal range has been established.

2 to 50 ng/ml thyroglobulin

In patients with total thyroidectomy no detectable thyroglobulin should be present after a x-ray therapy. Every increase of thyroglobulin to detectable serum concentrations is indicative for recidivation on thyroglobulin producing metastasis.

13 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

13.1 Parallelism

In dilution experiments sera with high thyroglobulin concentrations were diluted with sample buffer and assayed in the Thyroglobulin kit. The assay shows linearity over the full measuring range.

13.2 Precision (Reproducibility)

Statistics for coefficients of variation (CV) were calculated for each of three samples from the results of 24 determinations in a single run for Intra-Assay precision. Run-to-run precision was calculated from the results of 5 different runs with 6 determinations of each sample:

Intra-Assay			Inter-Assay		
Sample No	Mean (ng/ml)	CV (%)	Sample No	Mean (ng/ml)	CV (%)
1	33	1.9	1	31	1.7
2	93	2.4	2	88	1.7
3	227	3.2	3	212	1.1

13.3 Sensitivity

The lower detection limit for Thyroglobulin has been determined at 1.0 ng/ml.

13.4 Specificity

The antisera (polyclonal, rabbit) used for coating of the microplate and in the enzyme conjugate are highly specific for the human thyroglobulin molecule.

13.5 Calibration

The quantitative test system for Thyroglobulin is calibrated against the Certified Reference Material CRM 457 from BCR, Brussels for human Thyroglobulin.

14 LIMITATIONS OF PROCEDURE

The Thyroglobulin ELISA is a diagnostic aid. A definite clinical diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical and laboratory findings have been evaluated.

15 INTERFERING SUBSTANCES

No interference has been observed with haemolytic (up to 1000 mg/dL), lipemic (up to 3 g/dL triglycerides) or bilirubin (up to 40 mg/dL) containing sera.

Nor have any interfering effects been observed with the use of anticoagulants.

However for practical reasons it is recommended that grossly hemolyzed or lipemic samples should be avoided.

16 REFERENCES

1. Marriq, S. et al. Polypeptide chains of 19-S thyroglobulin from several mammalian species and of porcine 27-S iodoprotein. *Eur. J. Biochem.* 1977; 79: 143 - 149.
2. Gärtner, D.F. et al. Evidence for autonomous thyroglobulin release from euthyroid and hyperthyroid nodular goiters - Thyroglobulin, a possible helpful parameter in diagnosis of non-malignant thyroid disorders. *Klin. Wochenschr.* 1983; 61: 737 - 741.
3. Gebel, F. et al. The site of leakage of intrafollicular thyroglobulin into the blood stream in simple human goiter. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983; 57: 915 - 919.
4. Uller, R.P. and van Herle, A.J. Effect of therapy on serum thyroglobulin levels in patients with Graves` disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1978; 46: 747 - 755.
5. Gardner, et al. Serum thyroglobulin in normal subjects and patients with hyperthyroidism due to Graves` disease: effects of T3, iodine, 131J, and antithyroid drugs. *Clin. Endocr. (Oxf.)* 1979; 11: 585 - 594.
6. Kawamura, S. et al. Serum thyroglobulin changes in patients with Graves` disease treated with long term antithyroid drug therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983; 56: 507 - 512.
7. Czernichow, P. et al. Plasma thyroglobulin measurements help determine the type of thyroid defect in congenital hypothyroidism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983; 56: 242 - 245.
8. Mariotti, S. et al. Low serum thyroglobulin as a clue to the diagnosis of thyrotoxicosis factitia. *New Engl. J. Med.* 1982; 307: 410 - 412.
9. Reiners, C. Klinische Wertigkeit der Thyreoglobulinbestimmung im Serum. *Akt. Endokr. Stoffw.* 1984; 5: 76 - 82.
10. Kastrup, J. et al. An enzyme linked immunosorbent assay for measurement of human serum thyroglobulin. Evaluation of the influence of thyroglobulin autoantibodies. *Scand. J. Lab. Invest.* 1985; 45: 471 - 476.
11. Feldt-Rasmussen, U. et al. Serum thyroglobulin (Tg) in presence of thyroglobulin autoanti-bodies (TgAb). Clinical and methodological relevance of the interaction between Tg and TgAb in vitro and in vivo. *J. Endocrinol. Invest.* 1985; 8: 571 - 576.
12. van Herle, A.J. and Uller, R.P. Elevated serum thyroglobulin: a marker of metastases in differentiated thyroid carcinomas. *J. Clin. Invest.* 1975; 56: 272 - 277.

Test immunometrico per la determinazione quantitativa degli Tireoglobulina

Per uso diagnostico in vitro esclusivo.

1 CONTENUTO DEL KIT

1	Micropiastra a pozzetti separabili costituita da 12 strip da 8 pozzetti ciascuno, sensibilizzata con anticorpi policlinal anti-tireoglobulina. Pronta all'uso.
6 flaconi da 1,5 mL cad.	Calibratori contenenti tireoglobulina in matrice serica tamponata (PBS, BSA, Sodio Azide < 0,1% (p/p) alle seguenti concentrazioni : 0; 3; 10; 30; 100; 300 ng/ml. Pronti all'uso.
2 flaconi da 1,5 mL cad.	Controllo positivo (1) e normale (2) di tireoglobulina in matrice serica tamponata (PBS, BSA, Sodio Azide < 0,1% (p/p); le rispettive concentrazioni sono riportate nel foglietto illustrativo (Certificato di Controllo di Qualità). Pronti all'uso.
1 flaconi da 3 mL cad.	campioni del test di recupero (R) in matrice serica tamponata (PBS, BSA, Sodio Azide < 0,1% (p/p); concentrazione 50 ng/ml. Pronti all'uso.
1 flacone da 15 mL	Diluente campioni (TRIS, Sodio Azide < 0,1% p/p), giallo, Pronti all'uso.
1 flacone da 15 mL	Coniugato (PBS, Proclin 300 < 0.5 % v/v), rosa, contenente anticorpi policlinali di coniglio anti-tireoglobulina coniugati con perossidasi di rafano. Reagente pronto all'uso
1 flacone da 15 mL	TMB Substrato.Reagente pronto all'uso.
1 flacone da 15 mL	Soluzione Stoppante (contiene acido). Reagente pronto all'uso.
1 flacone da 20 mL	Tampone di lavaggio (PBS, Sodio Azide < 0,1% p/p), concentrato 50X

2 AVVERTENZE PRECAUZIONI

1. Tutti i reagenti del kit si intendono per esclusivo uso diagnostico in vitro
2. Non scambiare reagenti del kit con altri aventi lotto diverso da quelli presenti nel kit stesso
3. Reagenti contenenti siero umano sono stati testati con esito negativo per la presenza di HBsAg e HIV, con kit approvati dalla FDA.
4. Evitare il contatto con TMB (3,3', 5-5'-Tetrametilbenzidina); in caso di contatto di TMB con la pelle, lavare accuratamente con acqua e sapone
5. Evitare il contatto con la Stop Solution, che contiene acido. In caso di contatto con la pelle, lavare accuratamente con acqua e richiedere l'intervento medico.
6. Determinati reagenti (controlli, tampone del campione, soluzione di lavaggio tamponata) contengono sodio azide come conservante. Sodio azide è un composto altamente tossico e reattivo allo stato puro, tuttavia alle concentrazioni di utilizzo non è pericoloso. Nonostante la classificazione di materiale non pericoloso, vengono raccomandate procedure di laboratorio prudenti (vedi punti 8., 9., 10)
7. L'eliminazione dei reagenti contenenti Proclin 300 come conservante, deve avvenire con una abbondante lavaggio delle tubature idrauliche al fine di diluire il componente sotto il livello di attività.
8. Indossare guanti monouso nella manipolazione di campioni umani e dei reagenti contenuti nel kit, e lavare quindi le mani abbondantemente con acqua.
9. Non pipettare con la bocca
10. Non mangiare, bere, fumare, usare cosmetici nelle aree dove i reagenti vengono usati
11. Evitare il contatto tra la soluzione tamponata di Acqua Ossigenata e materiali facilmente ossidabili; temperature elevate possono provocare combustione spontanea

Osservare le linee guida per l'esecuzione delle procedure di controllo qualità nei laboratori medici, utilizzando materiali di controllo e pool di sieri di controllo. Osservare tutte le disposizioni di legge vigenti nella manipolazione dei reagenti contenuti nel kit, controlli, e campioni da analizzare.

3 CONSERVAZIONE E STABILITÀ

1. Conservare il kit a 4-8°C
2. Mantenere la micropiastra sigillata in una busta, con essicante, a tenuta di umidità
3. I reagenti sono stabili fino alla scadenza riportata sul kit
4. Mantenere i reagenti al riparo da calore, sole, luce solare diretta durante la conservazione e l'uso

5. Il tampone diluente il campione e il tampone di lavaggio sono stabili almeno 30 gg, se conservati a 2-8°C, dopo la loro preparazione.

4 MATERIALE NECESSARIO

Strumentazione

- Lettore di micropiastre con possibilità di misurazione end point, a 450 nm
- Dispensatore multicanale o pipetta sequenziale da 100 µl
- Pipette da 10, 100, 1000 µl
- Agitatore di tipo vortex
- Orologio da laboratorio
- Software per l'elaborazione dei dati

Preparazione dei reagenti

- acqua distillata o deionizzata
- cilindri graduati da 100 mL e 1000 mL
- bottiglie di plastica per la conservazione della soluzione di lavaggio

5 RACCOLTA, CONSERVAZIONE, MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

1. Il prelievo di sangue deve essere eseguito con le modalità necessarie per evitare l'emolisi del campione
2. Attendere che il campione sia coagulato e separare il siero per centrifugazione
3. Verificare che il siero sia non emolizzato. Sebbene emolisi e lipidi non interferiscono nella determinazione, è opportuno l'uso di campioni non lipemici e non emolizzati.
4. I campioni possono essere conservati a 4-8°C fino a 5 giorni, oppure a -20°C fino a 6 mesi
5. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni di siero. Ciò può causare una perdita di attività auto anticorpale.
6. Non è raccomandato testare sieri inattivati col calore.

6 AVVERTENZE OPERATIVE

1. Non usare kit scaduti
2. Non intercambiare componenti di kit con diversi numeri di lotto
3. Tutti i materiali devono essere conservati a temperatura ambiente
4. Preparare tutte le soluzioni di lavoro prima di iniziare il ciclo analitico; questo deve essere completato senza interruzioni al fine di ottenere risultati affidabili e coerenti
5. Utilizzare la procedura analitica indicata
6. Usare sempre campioni freschi
7. Pipettare reagenti e campioni sul fondo del pozzetto
8. Lavare accuratamente i pozzetti e rimuovere tutte le goccioline di tampone di lavaggio al fine di ottenere i risultati più corretti
9. Rispettare accuratamente i tempi di incubazione
10. Cambiare i puntali dopo la dispensazione di ciascun campione e dei controlli, al fine di evitare fenomeni di trascinamento
11. I sieri e i pool serici di controllo vanno trattati come campioni anonimi al fine di valutare le prestazioni dei reagenti
12. Non riutilizzare piastre già usate

Le concentrazioni dei controlli sono riportate sulle rispettive etichette; utilizzando queste concentrazioni è possibile costruire una curva di taratura ed ottenere dei risultati semiquantitativi.

7 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

7.1 Preparazione del Tampone di Lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ciascun flacone di tampone di lavaggio concentrato 50X con acqua distillata o demonizzata fino a un volume finale di 1000 ml.

Conservare in frigorifero: la stabilità è di almeno 30 gg a 2-8°C dalla data di preparazione, o fino alla data di scadenza stampata in etichetta.

8 ESECUZIONE DEL TEST

8.1 Recovery Test

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

La presenza di autoanticorpi tiroglobulina (anti-TG) può interferire con la determinazione con tiroglobulina nel siero. Pertanto, è necessario provare la presenza di autoanticorpi nei campioni dei pazienti.

Questo può essere eseguito o tramite misure quantitative con un test anti-TG o indirettamente tramite tests di ritrovabilità in combinazione con una determinazione quantitativa di tiroglobulina.

Per questa determinazione si aggiunge una concentrazione definita di TG esogena al siero del paziente.

La ritrovabilità di questa TG esogena può essere calcolata e evidenzia la presenza di autoanticorpi.

Questa misura fornisce una correlazione tra la ritrovabilità e la concentrazione di autoanticorpi presenti.

Comunque, né l'esatto contenuto di autoanticorpi, né l'esatta concentrazione di tiroglobulina nella presenza di anticorpi possono essere calcolati con questo metodo.

Per il test di ritrovabilità, i campioni devono essere determinati in doppio, direttamente e con l'aggiunta di tiroglobulina esogena. La percentuale di ritrovabilità è calcolata con la formula descritta sotto:

Nota: Il controllo per la ritrovabilità contiene 50 ng/ml tiroglobulina umana.

$$\% \text{ Recupero} = \frac{\text{ng/ml hTG (con controllo di recupero)}}{\text{ng/ml hTG (senza controllo di recupero) + 50 ng/ml}} \times 100$$

La ritrovabilità deve essere aspettata tra 80 e 120 %.

Se la percentuale ritrovata è inferiore o superiore a questo campo, i valori di tiroglobulina per i rispettivi campioni di pazienti devono essere esclusi e rideterminati.

8.2 Eseguito del test

1. Prelevare il numero di strip necessario per l'analisi in funzione del numero di campioni (P), controlli e calibratori e per il campione del test di recupero (R).
2. Dispensare 50 µl di calibratori, controlli e campioni nei rispettivi pozzetti
3. Dispensare 50 µl di Diluente campioni in ciascun pozzetto dei calibratori, controlli e campioni (P) e 50 µl della Controllo di Recupero della tiroglobulina nei pozzetti dei campioni (R).
4. Incubare per 60' a temperatura ambiente (20-28°C)
5. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio
6. Dispensare 100 µl di coniugato in ciascun pozzetto
7. Incubare per 60' a T.A.
8. Svuotare i pozzetti e lavare 3 volte con 300 µl di soluzione di lavaggio
9. Dispensare 100 µl di TMB in ciascun pozzetto
10. Incubare per 15' a T.A
11. Dispensare 100 µl di Soluzione Stoppante a ciascun pozzetto
12. Leggere la Densità Ottica a 450 nm e calcolare il risultato. È raccomandata una lettura in bicromatismo con una lunghezza d'onda di riferimento a 600-690 nm.

9 INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Controllo di Qualità

Il test è valido solo se la D.O. a 450 nm per il controllo positivo (1) e controllo negativo (2), così pure per il calibratore A e F cadono nei limiti indicati nel Certificato di Controllo di Qualità allegato a ciascun kit. Se tutti questi criteri non sono riscontrati, i risultati devono essere considerati non validi e il test deve essere ripetuto.

Calcolo dei risultati

L'elaborazione della curva dose/risposta raccomandata è quella logaritmica lineare a 4 parametri; possono essere utilizzate anche curve log-log o Smoothed spline

Curva logaritmica Lin-Log

Calcolare la D.O. media per ciascun pozzetto contenente i calibratori. Usare una carta diagrammata lin-log , riportare la media delle D.O e le rispettive concentrazioni, quindi estrapolare la curva.

Alternativamente, costruire una curva collegando punto per punto i singoli punti di calibrazione. La concentrazione dei campioni da analizzare è determinata tramite la curva di calibrazione così estrapolata.

Interpretazione dei risultati

tireoglobulina [ng/ml]

normale: 2 - 50 ng/ml

I risultati positivi devono essere confermati con un esame clinico del paziente. Ogni decisione clinica deve essere presa sulla base di una valutazione clinica individuale.











10 PRESTAZIONI DEL KIT











Precisione: Intra-assay: 1.9 - 3.2 %;

Inter-assay: 1.1 - 1.7 %

Sensibilità: 1.0 ng/ml

SYMBOLS USED WITH DRG ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità

Symbol	Portugues	Dansk	Svenska	Ελληνικά
	Consulte as instruções de utilização	Se brugsanvisning	Se bruksanvisningen	Εγχειρίδιο χρήστη
	Conformidade com as normas europeias	Europaeisk overensstemmelse	Europeisk överensstämmelse	Ευρωπαϊκή Συμμόρφωση
	Diagnóstico in vitro	In vitro diagnostik	Diagnostik in vitro	in vitro διαγνωστικό
				
	Catálogo n.º	Katalognummer	Katalog nummer	Αριθμός καταλόγου
	No do lote	Lot nummer	Batch-nummer	Αριθμός Παρτίδος
		Indeholder tilstrækkeligt til "n" test	Innehåller tillräckligt till "n" tester	Περιεχόμενο επαρκές για «n» εξετάσεις
	Temperatura de conservação	Opbevarings-temperatur	Förvaringstemperatur	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Prazo de validade	Udløbsdato	Bäst före datum	Ημερομηνία λήξης
	Fabricante	Producent	Tillverkare	Κατασκευαστής
Distributed by				
Content	Conteúdo	Indhold	Innehåll	Περιεχόμενο
Volume/No.	Volume/Número	Volumen/antal	Volym/antal	Όγκος/αριθ..