

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	9
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИРЕОГЛОБУЛИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации тиреоглобулина в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Тиреоглобулин (ТГ) – высокомолекулярный белок с молекулярной массой около 650-700 кДа, вырабатываемый эпителиальными клетками щитовидной железы. В нормальной щитовидной железе, ТГ вырабатывается в просвет фолликулов и подвергается ферментативному иодированию, в ходе которого высвобождаются предшественники гормонов Т3 и Т4. Вместе со свободными гормонами небольшие количества ТГ проникают в циркуляцию. Синтез ТГ регулируется гормонами гипофизарно-гипоталамической оси (тиролиберинном и ТТГ), а также самими гормонами щитовидной железы в случае их введения в терапевтических целях.

1.3. У больных с дифференцированной тиреоидной аденокарциномой серийное определение ТГ в сыворотке служит надежным мониторинговым маркером полноты резекции железы, рецидива и метастатического роста опухоли.

1.4. Значительное повышение уровня ТГ в сыворотке крови наблюдается также при доброкачественных заболеваниях щитовидной железы: тиреоидитах и гипертиреозах различной этиологии. При этом серийное определение ТГ может использоваться также в мониторинге и прогнозе тиреостатической терапии болезни Грейвса.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение тиреоглобулина основано на использовании «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы мышинные моноклональные антитела к тиреоглобулину человека. В лунках планшета, при добавлении исследуемого образца, происходит связывание ТГ, содержащегося в исследуемом образце, с антителами на твердой фазе. Образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата мышинных моноклональных антител к ТГ человека с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски прямо пропорциональна концентрации тиреоглобулина в исследуемом образце. Концентрацию тиреоглобулина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания тиреоглобулина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность.

Использование мышинных моноклональных антител к тиреоглобулину позволяет достичь высокой специфичности анализа

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ТГ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ТГ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ТГ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 10–400 нг/мл и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ТГ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 25 нг/мл. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА» концентрация ТГ в сыворотке (плазме) крови не превышает 1 нг/мл.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P232Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C232Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе трис-буфера (рН 7.2-7.4), содержащие известные количества тиреоглобулина – 0; 10; 25; 100; 400 нг/мл , готовы к использованию (калибровочная проба 0 нг/мл – 6 мл, остальные – по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости ярко-синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q232Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием тиреоглобулина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T232Z	CONJ HRP	Конъюгат , готов к использованию (5.5 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость ярко-синего цвета
5 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21x-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
9 K232I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА»	1	шт.	-
10 K232Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2a (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации тиреоглобулина в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Если предполагаемая концентрация ТГ в исследуемом образце превышает 400 нг/мл, его следует дополнительно развести, используя калибровочную пробу 0. Использование других буферов и реагентов для разбавления образцов может исказить результаты определения! Примечание. Для получения надежных результатов рекомендуется использовать несколько последовательных разведений исследуемого образца сыворотки (плазмы) крови.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
4	Внесите во все лунки по 50 мкл конъюгата.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставляйте по калибровочной пробе С1.
10	Постройте в линейных координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – концентрация ТГ в калибровочных пробах (нг/мл), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма подсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод.
11	Определите по калибровочному графику содержание ТГ в исследуемых образцах. Если исследуемый образец предразводили (см. п. 2), умножьте полученный результат на фактор разведения.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций ТГ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (1 нг/мл), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (400 нг/мл) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ТГ ниже 1 нг/мл или выше 400 нг/мл.

Исследуемая группа	Единицы, нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел
Здоровые доноры	–	50

11. ЛИТЕРАТУРА

1. CA Spencer, M Takeuchi, and M Kazarosyan – Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. Clin. Chem., Jan 1996; 42: 164 – 173.
2. PW Ladenson – Optimal laboratory testing for diagnosis and monitoring of thyroid nodules, goiter, and thyroid cancer. Clin. Chem., Jan 1996; 42: 183 – 187.
3. Anthony P. Weetman – Graves' Disease. N. Engl. J. Med., Oct 2000; 343: 1236 – 1248.

По вопросам, касающимся качества Набора «**ТИРЕОГЛОБУЛИН-ИФА**», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:

105043, Москва, а/я 58,

тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru

интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,

к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF THYROGLOBULIN IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of thyroglobulin in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of thyroglobulin in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Thyroglobulin (TG) is a high MW (ca. 650-700 kDa) glycoprotein synthesized by the thyroid epithelial cells. In normal thyroid gland, TG is secreted to the follicular lumen and undergoes iodination of tyrosine residues leading to formation of thyroid hormones (T3 and T4). Minor quantities of TG penetrate to the circulation in normal donors. Synthesis of TG is regulated by hormones (TSH, TRH, exogenous thyroid therapy).

In differentiated thyroid carcinoma, serial determination of serum TG is used for post-treatment monitoring. An elevation of serum TG in such patients indicates a presence of residual thyroid tissue, relapse or metastatic growth of the tumour.

The elevated serums TG are also observed in benign thyroid diseases, e.g. thyroiditis, hyperthyroidism and non-toxic goiter. The monitoring of serum TG is also used for prognostic evaluation of thyrostatic treatment of Graves' disease.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific murine monoclonal to human TG-antibodies. Antigen from the specimen is captured by the antibodies coated onto the microwell surface. Second antibodies – murine monoclonal to human TG, labelled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	Thyroglobulin EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.8 ml each, zero calibrator C1-6 ml. The set contains 5 calibrators: 0; 10; 25; 100; 400 ng/ml	5	pcs	bright blue (C1 – colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ HRP	Conjugate, 5.5 ml	1	pcs	bright blue	until exp. date
5 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate – until exp. date Diluted washing solution – 1 month at 2-8°C or 5 days at RT
7 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
8 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9 K232I	Instruction Thyroglobulin EIA	1	pcs		N/A
10 K232Q	QC data sheet Thyroglobulin EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	If suggested analyte concentration in the sample exceeds the highest calibrator, additionally dilute this sample accordingly, using zero calibrator. Use of other buffers or reagents for sample dilution may lead to incorrect measurement.
3	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.
4	Dispense 50 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 60 minutes at 37 °C .
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on first calibrator
12	Apply point-by-point method for data reduction.

8. 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.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

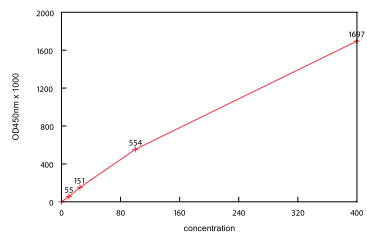
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus thyroglobulin concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of thyroglobulin in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm)
CAL 1	0 ng/ml	0.13
CAL 2	10 ng/ml	0.19
CAL 3	25 ng/ml	0.28
CAL 4	100 ng/ml	0.69
CAL 5	400 ng/ml	1.83



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for Thyroglobulin. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	–	50

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical sensitivity.

Sensitivity of the assay was assessed as being 1 ng/ml.

11.2. Linearity.

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different thyroglobulin concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.3. Recovery.

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known thyroglobulin concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. CA Spencer, M Takeuchi, and M Kazarosyan – Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays. Clin. Chem., Jan 1996; 42: 164 – 173.
2. PW Ladenson – Optimal laboratory testing for diagnosis and monitoring of thyroid nodules, goiter, and thyroid cancer. Clin. Chem., Jan 1996; 42: 183 – 187.
3. Anthony P. Weetman – Graves' Disease. N. Engl. J. Med., Oct 2000; 343: 1236 – 1248.

