



DiaMetra



THYROGLOBULIN

per analisi di routine

Determinazione della Tireoglobulina nel siero o nel plasma umano

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO048

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della Tireoglobulina nel siero o nel plasma umano.

APPLICAZIONI CLINICHE

La Tireoglobulina (TG), glicoproteina di peso molecolare pari a 660.000 dalton circa, è la principale iodoproteina della tiroide e costituisce il componente più importante della colloide follicolare. La Tireoglobulina costituisce la forma con la quale vengono depositati gli ormoni attivi, T3 e T4, e i loro precursori immediati all'interno della ghiandola tiroidea, MIT e DIT. Le applicazioni cliniche del dosaggio della TG sembrano derivare dalla sua specificità per la tiroide e cellule correlate alla tiroide.

Il dosaggio dell' TG può essere utilizzato come supporto ad analisi scintigrafiche ed altre tecniche nello studio della patogenesi, nella formulazione della diagnosi e nell' analisi del decorso dei disordini tiroidei.

In caso di ipotiroidismo da agenesi tiroidea, l' TG è indosabile prima e dopo terapia sostitutiva con L-Tiroxina. Se l' ipotiroidismo è di tipo secondario a gozzo da disormogenesi o a tiroide ectopica, la TG presenta livelli normali o elevati. I livelli circolanti di TG tendono ad aumentare in una varietà di malattie tiroidee come il gozzo tossico e atossico, tiroidite subacuta, morbo di Basedow e carcinoma. Il dosaggio della TG è di interesse potenziale nel morbo di Basedow come indice di normalizzazione dello stato ipertiroideo in pazienti trattati con farmaci anti-tiroide. Applicazioni molto promettenti, legate alla capacità dei tessuti tumorali tiroidei di concentrare lo iodio e sintetizzare la TG come la tiroide normale, riguardano il campo della oncologia tiroidea, in particolare il carcinoma tiroideo differenziato. In linea di principio il dosaggio della TG può essere utilizzato come segue

Diagnosi pre-operatoria di tumore tiroideo.

Questa applicazione non permette la diagnosi differenziale del tumore a causa della sovrapposibilità dei valori di TG osservati nei noduli maligni e benigni.

Monitoraggio post-operatorio

I livelli elevati di TG prolungati nel tempo suggeriscono la presenza di carcinoma tiroideo residuo e/o metastatico nei pazienti trattati chirurgicamente o con radioterapia.

Controllo dei pazienti totalmente tiroidectomizzati.

E' di provato valore clinico l'uso della TG circolante come indicatore di tumore ricorrente (marker metastatico): l'aumento della tireoglobulinemia indica la necessità di sottoporsi ad ulteriori analisi di conferma diagnostica. Interessanti vantaggi possono scaturire a) dal diminuito utilizzo di tecniche diagnostiche scintigrafiche il cui impiego richiede la sospensione periodica della terapia di sostituzione e la frequente esposizione a radiazioni, b) e dal completamento dell' informazione diagnostica ottenute tramite scintigrafia

2. PRINCIPIO

Il presente kit è basato sul metodo del dosaggio immunoenzimometrico (IEMA). Vengono utilizzati quattro differenti anticorpi monoclonali anti-TG, tre dei quali adsorbiti sui pozzetti e il quarto marcato con biotina. Durante l'incubazione, la TG presente nei calibratori e nei campioni si lega contemporaneamente sia agli anticorpi della fase solida che al biotinilato, formando un "sandwich". Al termine dell'incubazione, il materiale non legato viene rimosso mediante aspirazione e lavaggio. Viene successivamente aggiunta a tutti i pozzetti una soluzione di streptavidina coniugata con perossidasi (HRP), che reagisce con gli anticorpi biotinilati legati sul pozzetto. Dopo una seconda fase di aspirazione e lavaggio, l'attività enzimatica rimasta fissata sulla fase solida sarà quindi direttamente proporzionale alla concentrazione di TG nei calibratori e nei campioni, e viene evidenziata aggiungendo ai pozzetti una soluzione di Cromogeno (tetrametilbenzidina, TMB) in Tampone Substrato. L'intensità del colore sviluppato viene misurata mediante uno spettrofotometro a 450 nm e a 405 nm.

2. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

2.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. **Siero di Riferimento- (Standard)**
 - STD₀ (1 flacone) 2,0 mL **REF** DCE002/4806-0
 - STD₁ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4807-0
 - STD₂ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4808-0
 - STD₃ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4809-0
 - STD₄ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4810-0
 - STD₅ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4811-0
 - STD₆ (1 flacone) 1,0 mL **REF** DCE002/4812-0
2. **Control serum I**
 - TG in matrice proteica (1 flacone) 1 mL **REF** DCE021/4821-0
3. **Control serum II**
 - TG in matrice proteica (1 flacone) 1 mL **REF** DCE022/4822-0
4. **Anti humanTg Biotin** **REF** DCE019/4819-0
 - Biotinylated anti human TG (1 flacone) 13 mL
5. **Enzyme Conjugate** (1 flacone) 15 mL
 - Streptavidina-HRP **REF** DCE002/4802-0
 - Coated Microplate **REF** DCE002/4803-0
6. **Anti TG coated microplate** (1 micropiastra breakable)
7. **Recovery solution** (1 flacone) 3 mL **REF** DCE023-0
 - TG in matrice proteica 50 ng/mL
8. **Concentrated wash solution 20X** (1 flacone) 50 mL
 - NaCl 9 g/L; Tween-20 22 g/L **REF** DCE007-0
9. **TMB-substrate** (1 flacone) 12 mL **REF** DCE004-0
 - H₂O₂ TMB 0,26 g/L (evitare il contatto con la pelle)
10. **Stop solution** (1 flacone) 12mL **REF** DCE005-0
 - Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

2.2 Note

- Conservare tutti i reattivi a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$, al riparo dalla luce.
- Aprire la busta del Reattivo 6 (Coated Microplate) *solo dopo averla riportata a temperatura ambiente* e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.
- Non usare reagenti dopo la data di scadenza.
- I reagenti aperti, conservati a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ sono stabili per (60) gg
- Gli Standard (7 flaconi) hanno le seguenti concentrazioni di 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 ng/mL. Conservare a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$.

MATERIALI Richiesti ma non forniti:

1. Pipette da $50\mu\text{L}$ con una precisione migliore dell' 1,5%.
2. Pipette sequenziali per volumi di 0,100mL e 0,300mL con una precisione migliore dell' 1,5%.
3. Microplate washer o bottiglia a spruzzo.
4. Microplate Reader con assorbanze a 405 nm, 450nm e 620nm.
5. Carta Assorbente per asciugare le microplate wells.
6. Coperchio in plastica o strip adesiva per coprire le micropiastre durante l'incubazione.
7. Timer

3. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

Per ottenere risultati corretti e riproducibili, è necessario osservare le seguenti norme:

Non mescolare i reagenti specifici di lotti differenti.

E' possibile utilizzare reagenti comuni di lotti differenti.

Non usare i reagenti dopo la data di scadenza.

Non esporre i reattivi e i campioni a calore intenso o a forti sorgenti di inquinamento.

Usare vetreria perfettamente pulita ed esente da contaminazioni di ioni metallici o sostanze ossidanti.

Usare acqua distillata o deionizzata, conservata in recipienti perfettamente puliti.

Evitare accuratamente contaminazioni tra campioni; a tal fine è consigliabile usare pipette con puntali monouso per ogni campione e per ogni reattivo.

Non modificare in alcun modo il Procedimento Operativo di esecuzione del test. Eventuale non rispetto di:

sequenza e quantità nell'aggiunta dei reattivi

tempi e temperatura di incubazione

può dare luogo a risultati clinici errati.

Ricostituire gli eventuali reagenti liofilici secondo le modalità descritte sulle etichette. Eventuale utilizzo di reattivi o volumi non idonei, può provocare l'ottenimento di dati clinici non attendibili.

In caso di procedura manuale è importante l'utilizzo di pipette calibrate e possedere un'adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nella preparazione e dispensazione dei reattivi. E' necessario un adeguato piano di manutenzione (pulizia e calibrazione) di tale strumentazione.

Accertarsi che tutta la strumentazione usata (vetreria, agitatore e lavatore per micropiastre, spettrofotometro, stufa termostata, frigoriferi usati per la conservazione dei kit e dei campioni) sia perfettamente funzionante, adeguatamente calibrata e sia soggetta ad un regolare piano di manutenzione. Un uso non accurato di ognuno di questi strumenti può produrre errori metodologici che possono condizionare la riproducibilità e l'affidabilità dei risultati ottenuti.

Utilizzare un adeguato metodo per la corretta identificazione dei campioni. Possibili conseguenze possono essere sia la perdita di specificità del dispositivo che risultati analitici errati.

Utilizzare un adeguato metodo per la corretta identificazione dei campioni. Possibili conseguenze possono essere sia la perdita di specificità del dispositivo che risultati analitici errati.

Per evitare contaminazioni personali ed ambientali, è necessario osservare le seguenti norme di sicurezza:

Utilizzare guanti monouso durante la manipolazione di materiale potenzialmente infetto e durante il dosaggio.

Non pipettare i reagenti con la bocca. Non fumare, mangiare, bere o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.

Le soluzioni di Cromogeno e Reagente Bloccante vanno manipolate con cautela. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. In caso di incidente lavare abbondantemente con acqua.

I materiali di origine umana utilizzati nella preparazione del presente kit sono stati saggiati per la presenza di HBsAg, anti-HIV e anti-HCV e sono risultati ripetutamente negativi. Comunque nessun test attualmente disponibile garantisce l'assenza degli agenti virali responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita, dell'epatite B ed epatite C. Tutti i reagenti contenenti materiale biologico e tutti i campioni di siero umano devono essere considerati potenzialmente infettivi.

Evitare la produzione di schizzi e la formazione di aerosol; qualora ciò si verificasse ripulire accuratamente con ipoclorito di sodio ad una concentrazione del 3%. Il mezzo adoperato per la pulizia deve essere trattato come residuo potenzialmente infetto ed eliminato secondo le modalità opportune.

La sodio azide contenuta come conservante in alcuni reagenti, può reagire con il piombo ed il rame delle tubature formando azidi di metallo altamente esplosive. Per evitare la formazione e l'accumulo di tali composti far scorrere abbondante acqua sui reagenti eliminati. I reagenti per cui non si fornisce la scheda di sicurezza non contengono sostanze chimiche pericolose o se presenti, queste sono al di sotto dei limiti di concentrazione definiti nel D.Lgs.285/98 e nella direttiva CEE 91/155.

Ai sensi del D.L. italiano n. 22 del 05.02.97, che fa riferimento alle direttive CEE (91/156/CEE, 91/689/CEE, 94/62/CEE) tutti i rifiuti provenienti da lavorazioni manuali e/o in automatico sono classificati rifiuti speciali pericolosi con codice di classificazione CER 180103; devono quindi essere eliminati affidandoli a ditte autorizzate al ritiro ed allo smaltimento.

3.1 PREPARAZIONE DEI REAGENTI:

Wash Solution – Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (20x) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:20. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ per almeno 30 giorni.

4. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio può essere effettuato su siero o plasma umano. I campioni fortemente lipemici od emolizzati devono essere scartati. I campioni possono essere conservati a $2\pm 8^{\circ}\text{C}$ per 1-2 giorni; per periodi più lunghi conservarli a -20°C . Si consiglia di non congelare e scongelare ripetutamente i campioni.

Diluire i campioni con contenuto presunto di TG maggiore di 300 ng/mL con il Standard Zero. Si consiglia una diluizione 1:5 (100 μL di campione + 400 μL di Standard Zero).

5 PROCEDURA

Poichè è necessario operare in doppio, allestire due per ogni punto della curva Standard (S_0-S_6), due per ogni Campione
Dispensare:

	Blank	Standard	Sample/Control
Sample/Control	---	---	50 μL
Standard $S_0 - S_6$	---	50 μL	---
Anti Tg biot.	---	100 μL	100 μL

Incubare a 37°C per 90 minuti

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto.

Lavare ogni pozzetto con 0.3 mL di washing solution diluita ed allontanare il liquido in eccesso battendo delicatamente la micropiastro su carta assorbente. Ripetere l'operazione 2 volte

Dispensare:

	Blank	Standard	Sample/Control
Enzyme conjugate	---	100 µL	100 µL

Incubare a 37°C per 30 minuti.

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto.

Lavare ogni pozzetto con 0.3 mL di washing solution ed allontanare il liquido in eccesso battendo delicatamente la micropiastro su carta assorbente. Ripetere l'operazione 2 volte

Dispensare :

	Blank	Standard	Sample/Control
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL

Incubare a *Temperatura Ambiente* (22-28°C) per 15 minuti, al riparo dalla luce.

Dispensare

	Blank	Standard	Sample/Control
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL

Agitare delicatamente la piastra. Determinare l'assorbanza (E) a 450 nm per ogni pozzetto dopo aver azzerato lo strumento con lo standard S0.

6. CALCOLO DEI RISULTATI

Al fine di ottenere una migliore sensibilità, il presente metodo utilizza una lettura spettrofotometrica a due lunghezze d'onda (450 e 405 nm). Per campioni con concentrazioni di TG compresa tra 0 e 30 ng/mL dovrà essere utilizzata la misura a 450 nm; per campioni con livelli di TG superiori a 30 ng/mL, il calcolo dovrà essere effettuato sulle misure a 405 nm.

Disegnare la curva di calibrazione su carta millimetrata, riportando sull'asse delle ascisse le dosi dei calibratori e su quello delle ordinate l'assorbanza ottenuta per ciascuno standard. Interpolando sulla curva di calibrazione le assorbanze relative a ciascun campione si otterranno le corrispondenti concentrazioni di TG in ng/mL; nel caso di campioni diluiti, queste saranno moltiplicate per il fattore di diluizione.

6.1 Esempio di Calcolo

I valori sotto riportati devono essere considerati unicamente un esempio e non devono essere utilizzati in luogo dei dati sperimentali.

Standard/Campione	O.D. 450 nm	TG	O.D. 405 nm	TG
Standard 0 ng/mL	0,020		0,007	
Standard 1 ng/mL	0,047		0,015	
Standard 3 ng/mL	0,127		0,042	
Standard 10 ng/mL	0,313		0,098	
Standard 30 ng/mL	0,863		0,373	
Standard 100 ng/mL	1,650		0,603	
Standard 300 ng/mL	> 3,000		1,488	
Campione 1	0,450	15,4 ng/mL	0,141	
Campione 2	2,240		0,829	166,4 ng/mL

6.2 Valori Normali

I valori riportati sono soltanto indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

I valori normali sono stati determinati utilizzando soggetti sani (n. 85), senza disfunzioni tiroidee, e i livelli di tireoglobulina sono risultati inferiori a 40 ng/mL.

6.3 Criteri di accettazione

Prima di procedere al calcolo dei risultati, verificare che la concentrazione del siero di controllo rientri nel range di accettazione descritto nel Foglio di Controllo Qualità.

7. CARATTERISTICHE METODOLOGICHE

7.1 Specificità

Non si sono osservate reazioni crociate con MIT, DIT, rT3, T3, T4, TSH, FSH e LH. Il presente metodo analitico ha mostrato una cross-reattività pari allo 0,01% con TBG umani.

7.2 Sensibilità

La sensibilità è stata calcolata sulla curva di calibrazione ed espressa come minima dose significativamente distinguibile dalla risposta del Standard Zero (valore medio + 2 D.S.). Tale dose è risultata pari a 0,15 ng/mL.

7.3 Precisione

La precisione è stata valutata misurando la ripetibilità e la riproducibilità (variabilità intra-saggio ed inter-saggio) su 3 sieri a differenti concentrazioni di TG.

Ripetibilità (Intra-saggio)

Siero	Media (ng/mL)	±	D.S.	% C.V.	Replicati n.
1	152,41	±	5,71	3,75	10
2	15,14	±	0,26	1,71	10
3	1,69	±	0,10	6,14	10

Riproducibilità (Inter-saggio)

Siero	Media (ng/mL)	±	D.S.	% C.V.	Dosaggi n.
1	150,4	±	9,3	6,2	10
2	38,1	±	3,0	7,8	10
3	1,8	±	0,13	6,9	10

7.4 Accuratezza

L'accuratezza del metodo è stata valutata mediante il test di recupero ed il test di parallelismo.

Test di Recupero

Quantità scalari di TG sono state aggiunte a due sieri normali e dosate.

Aggiunto (ng/mL)	Misurato (ng/mL)	Recuperato (ng/mL)	Recupero %
S1	1,9	---	---
S1 + 12,5	14,9	13,0	104,0
S1 + 25	25,2	23,3	93,2
S1 + 50	50,7	48,8	97,6
S1 + 100	93,6	91,7	91,7
S1 + 200	195,00	193,1	96,6
S2	17,4	---	---
S2 + 12,5	27,0	9,6	76,8
S2 + 25	42,0	24,6	98,4
S2 + 50	65,0	47,6	95,2
S2 + 100	116,2	98,8	98,8
S2 + 200	205,1	187,7	93,9

Test di Parallelismo

Due sieri ad elevato contenuto di TG sono stati dosati a varie diluizioni con il Standard Zero.

Diluizione	Atteso (ng/mL)	Misurato (ng/mL)
S1 non diluito	---	179,50
1:2	89,75	84,75
1:4	44,88	47,57
1:8	22,44	28,46

S2 non diluito	---	25,69
1:2	12,85	15,05
1:4	6,42	6,97
1:8	3,21	3,83

7.5 Correlazione

Il kit TG ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio (TG Zentech Irma Kit). Sono stati testati 66 campioni di siero. La curva di regressione è:

$$TG \text{ Zentech} = 1.029 * TG \text{ Diametra} + 2.069 \quad (R^2=0.952)$$

8. RECUPERO NEL CAMPIONE DI SIERO

La presenza di autoanticorpi anti-TG in un campione interferisce con il dosaggio della TG e può quindi determinare dei risultati non accurati. E' pertanto necessario eseguire un test di recupero clinico per confermare l'accuratezza del risultato. Questo test non deve essere considerato un metodo per la rilevazione degli anticorpi anti-TG.

Procedimento:

Diluire 1/2 il campione di siero con la Soluzione di Recupero, per esempio 50 µL di campione + 50 µL di soluzione di recupero. La concentrazione di TG nella soluzione di recupero è 50 ng/mL (SR).

Dosare il campione indiluito (S1) e quello diluito 1/2 con la soluzione di recupero (S2) come descritto nello schema del dosaggio.

Il recupero percentuale di TG per un campione è calcolato come segue:

$$\text{Recupero (\%)} = \frac{\text{ng/mL campione S2}}{(\text{ng/mL campione S1} + 50)/2} \times 100$$

Recuperi < a 75% e >120% indicano presenza di interferenze da autoanticorpi anti-TG.

9. LIMITI DEL DOSAGGIO

I risultati del dosaggio devono essere interpretati con cautela e convalidati da valutazioni cliniche ed ulteriori prove diagnostiche

BIBLIOGRAFIA-REFERENCES

1. Ruiz-Garcia J., Ruiz de Almodóvar J. M., Olea N., Pedraza V. Thyroglobulin level as a Predictive Factor of Tumoral Recurrence in Differentiated Thyroid Cancer. *J. Nuclear Medicine*, 1991, **32** (3), 395-398.
2. Pacini F., Pinchera A., Giani C., Grasso L., Doveri F., Baschieri L. Serum thyroglobulin in thyroid carcinoma and other thyroid disorders. *J. Endocrinol. Invest.*, 1980, **3**, 283-292.
3. Rubello D., Girelli M. E., Casara D., Piccolo M., Perin A., Busnardo B. Usefulness of the combined antithyroglobulin antibodies and thyroglobulin assay in the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *J. Endocrinol. Invest.* 1990, **13**, 737-742.
4. Sheppard M. C. Serum Thyroglobulin and Thyroid Cancer. *Quarterly J. Medicine. New Series*, 1986, **59** (229), 429-433.
5. Tourniaire J., Bernard M. H., Ayzac L., Nicolas M. H., Bornet H. Dosage de la thyroglobuline sérique après lobectomie thyroïdienne totale unilatérale pour cancer thyroïdien différencié. *La Presse Médicale*, 1990, **19** (28), 1309-1312.

6. Pacini F., Elisei R., Fugazzola L., Pinchera A. Humoral Markers for Thyroid Carcinoma in Clinical Practice. *Diagn. Oncol.*, 1991, **1**, 194-196.
7. Chatherine Massart, Didier Maugendre. Importance of detection Method for Thyroglobulin Antibodies for the validity of Thiroglobulin measurements in sera from patients with Graves Disease. *Clin. Chem.* 2002, **48** (1), 108-107.

Ed 06/2010

DCM048-5

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI)

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufact: Via Giustozzi, 35/35a (già via Bartolomei) – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) ITALY.

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DiaMetra



THYROGLOBULIN

for routine analysis

Determination of Thyroglobulin in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO048

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Thyroglobulin concentration in human serum or plasma.

CLINICAL APPLICATIONS

Thyroglobulin (TG), a glycoprotein with a molecular weight of about 660,000 Daltons, is the thyroid's main iodine protein and the most important compound of follicular colloid. Thyroglobulin is the form under which the active hormones T₃ and T₄ together with their immediate forerunners MIT and DIT are laid inside the thyroid gland. The clinical applications of the TG dosage seem to originate from its specificity for the thyroid and related cells.

The dosage of TG can be used as support to scintigraphies or other techniques for studying pathogenesis, making a diagnosis and analyzing the course of thyroid disorders.

The dosage of TG before and after replacement treatment with L-Thyroxin cannot be established in cases of hypothyroidism due to thyroid agenesis. In cases of secondary hypothyroidism with a dysglandular goiter or ectopic thyroid, the levels of TG are normal or high. The circulating levels of TG tend to increase in several thyroid disorders such as toxic and atoxic goiter, subacute thyroiditis, Basedow's disease and carcinoma. In Basedow's disease the TG dosage is a potentially interesting index of normalization of hyperthyroidism in patients treated with anti-thyroid drugs. In the oncology field and more specifically for differentiated thyroid carcinoma, there are very promising applications linked to the ability of thyroid tumors tissues to concentrate iodine and synthesize TG as a normal thyroid. Basically the dosage of TG can be used as follows:

a. Pre-operating diagnosis of thyroid tumors.

This application does not allow the differentiated diagnosis of the tumor as the values of TG seen in malignant and benign nodules are superimposable.

b. Post-operation monitoring

In patients treated surgically or with radiotherapy, long lasting TG levels suggest the presence of a residual carcinoma and/or carcinoma with metastasis.

c. Monitoring of totally thyroidectomized patients

The use of circulating TG as an indicator of recurrent tumors (metastasis marker) has an established clinical value: the increase of Thyroglobulinaemia indicates the need to undergo further analysis for confirming the diagnosis. Interesting advantages can come from: a) a reduced use of scintigraphic diagnostic techniques as they imply regular suspension of replacement treatment and frequent exposure to radiation, b) and complete completion of the information obtained via scintigraphy

1. PRINCIPLE

This kit is based on an immunoenzymometric assay (IEMA). Four different anti-TG monoclonal antibodies are used, three coated on the wells and the fourth conjugated to Biotin. During incubation, the TG present in the calibrators and samples is bound to the antibodies and biotinylate forming a "sandwich". At the end of the incubation, the unbound material is removed by an aspiration/washing cycle. A solution of streptavidin conjugated with peroxidase (HRP) is then added to all wells. This will react with the biotinylated antibodies which are bound to the well. After a further aspiration/washing cycle, the residual enzyme activity found in the wells will thus be directly proportional to TG concentration in the calibrators and samples and evidenced by adding into the wells a Chromogen solution (tetramethylbenzidine, TMB) in a Substrate-Buffer. Colorimetric reading will be performed by using a spectrophotometer at 450 nm and at 405 nm wavelength.

2. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATIONS

2.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. Reference Serum- (Standard)

STD ₀ (1 vial) 2.0 mL	REF DCE002/4806-0
STD ₁ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4807-0
STD ₂ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4808-0
STD ₃ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4809-0
STD ₄ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4810-0
STD ₅ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4811-0
STD ₆ (1 vial) 1.0 mL	REF DCE002/4812-0
	REF DCE021/4821-0

2. Control serum I

TG in proteic matrix (1 vial) 1 mL

3. Control serum II

TG in proteic matrix (1 vial) 1 mL

4. Anti humanTg Biotin

Biotinylated anti human TG (1 bottle) 13 mL

5. Enzyme Conjugate (1 bottle) 15 mL

Streptavidine-HRP

6. Coated Microplate

Anti TG coated microplate (1 micropatle breakable)

7. Recovery solution (1 vial) 3 mL

TG in proteic matrix 50 ng/mL

8. Concentrated wash solution 20X (1 bottle) 50 mL

NaCl 9 g/L; Tween-20 22 g/L

9. TMB-substrate (1 bottle) 12 mL

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

10. Stop solution (1 bottle) 12 mL

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

2.2 Note

- Store the reagents at 2±8°C
- Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use. Once opened, it is stable until the expiration date of the kit
- Do not use reagents beyond the kit expiration date.
- Opened reagents are stable for sixty (60) days when stored at 2±8°C.
- Human Serum Reference (STANDARD) 7 vials of serum reference for at concentrations of 0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 ng/mL. Store at 2±8°C. A preservative has been added.

MATERIALS Required But Not Provided:

1. Pipette capable of delivering 50µl volumes with a precision of better than 1.5%.
2. Dispenser(s) for repetitive deliveries of 0.100mL and 0.300mL volumes with a precision of better than 1.5%.
3. Microplate washer or a squeeze bottle (optional).
4. Microplate Reader with 405 nm, 450nm and 620nm wavelength absorbance capability.
5. Absorbent Paper for blotting the microplate wells.
6. Vacuum aspirator (optional) for wash steps.
7. Timer.

3.WARNINGS AND PRECAUTIONS

In order to obtain correct and reproducible results, the following rules must be observed:

- Do not mix specific reagents from different lots.
- It is possible to use common reagents from different lots.
- Do not use reagents beyond their expiry date.
- Do not store or leave reagents and samples at high temperatures or areas of possible contamination.
- Use thoroughly clean glassware, free from metal ion contamination or oxidizing substances.
- Use distilled or deionized water, stored in perfectly clean containers.
- Carefully avoid any contamination among samples; for this purpose, disposable tips should be used for each sample and reagent.
- Do not modify in any way the "Assay Procedure". If you not respect:
 - exact incubation times and quantities adding the reagents incubation times and temperature may cause incorrect clinical results.
 - Reconstitute lyophilized reagents, if present, as described on the relative labels. Any deviation in reagent use or wrong volumes, may affect the reliability of results obtained.
 - In case of manual procedure, it is important to use calibrated pipettes and have appropriate technical manuals. Primary importance is a good precision preparing and dispensing the reagents. Ensure that all the equipment used is in perfect working order, has been correctly calibrated and is regularly maintained.
 - Ensure that all the equipment used (glassware, dry heater, microplate shaker, microplate washers, spectrophotometer and fridge/freezers used for reagent and sample storage) is in perfect working order, has been correctly calibrated and is regularly maintained. Any deviation from the correct use of the equipment listed can produce errors in the methodology, this may affect the reproducibility and reliability of results obtained.

- Utilise a suitable method for the correct identification of patient samples. Incorrect identification may cause a specificity losses of the system and wrong clinical results.

In order to avoid personal and environmental contamination, the following precautions must be observed:

- Use disposable gloves while handling potentially infectious material and while performing the assay.
- Do not pipette reagents by mouth.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics during the assay.
- Chromogen and Blocking Reagent should be handled with care. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. In case of accident rinse thoroughly with running water.
- All material of human origin used for the preparation of this kit tested negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV. Since no test at present can guarantee complete absence of these viruses, all samples and reagents containing biological material used for the assay must be considered potentially infectious.
- Avoid splashing and aerosol formation; in such cases, carefully wash with a 3% sodium hypochlorite solution. Any such cleaning material must be treated as potentially infectious and disposed of accordingly.
- Some reagents contain sodium azide as preservative; to prevent build-up of explosive metal azides in lead and copper plumbing, reagents should be discarded by flushing the drain with large amounts of water.
- The reagents for which a Safety Data Sheet is not supplied do not contain hazardous chemical substances or, if they do, these are below the concentration limits established by the Italian decree D.Lgs.285/98 in compliance with EEC directive 91/155.
- According to Italian decree D.L. no. 22 dated 05.02.97, in compliance with EEC directives (91/156/EEC, 91/689/EEC, 94/62/EEC), all waste products originating from either manual and/or automated processing are classified as hazardous special waste material (European classification code180103). As such, they must be eliminated by delegating to special enterprises, qualified for waste collection and disposal.

3.1 REAGENT PREPARATION:

Wash Solution - Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (20x) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:20 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2±8°C.

4. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The assay can be performed in human serum or plasma samples. Highly lipemic or hemolyzed samples must be discarded. Keep samples at 2±8°C for 1-2 days; for longer periods it is advisable to freeze samples at -20°C. Repeated freezing and thawing of samples should be avoided. Samples with TG concentrations higher than 300 ng/mL, must be diluted with the Zero Calibrator. We suggest a dilution of 1:5 (100 µL of sample + 400 µL of Zero Calibrator).

5 PROCEDURE

As it is necessary to perform in duplicate, each determination should also include two wells for each *Sample*, two wells for each *Serum Control* and two wells and for each point of standard curve.

	Blank	Standard	Sample/Control
Sample/Control	---	---	50 µL
Standard S ₀ – S ₆	---	50 µL	---
Anti Tg biot.	---	100 µL	100 µL

Incubate at 37°C for 90 minutes

Remove the contents from each well.

Wash three times each well with 0.3 mL of diluted washing solution, leave the excess liquid to drain away by inverting the plate on absorbent paper. Dispense into each well:

Dispense:

	Blank	Standard	Sample/Control
Enzyme conjugate	---	100 µL	100 µL

Incubate at 37°C for 30 minutes

Remove the contents from each well.

Wash three times each well with 0.3 mL of diluted washing solution, leave the excess liquid to drain away by inverting the plate on absorbent paper. Dispense into each well:

	Blank	Standard	Sample/Control
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL

Incubate at Room Temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.

Dispense

	Blank	Standard	Sample/Control
Stop solution	100 µL	100 µL	100 µL

Shake the microplate gently. Determine the absorbance (E) by reading at 450 nm for each test-well (within 30 minutes after the addition of the Stop solution) after zeroing the instrument with the S₀.

6. CALCULATION OF RESULTS

In order to obtain a better sensitivity, the present method employs spectrophotometric reading at two wavelengths (450 and 405 nm). For samples with TG concentrations ranging from 0 to 30 ng/mL, read at 450 nm wavelength; for samples with TG level higher than 30 ng/mL, read at 405 nm wavelength.

Draw a calibration curve on millimetric graph paper, by plotting the calibrator concentrations (x-axis) against the absorbance obtained for each calibrator (y-axis). Corresponding TG concentrations in µIU/mL are obtained by interpolating the absorbances of each sample on the calibration curve; in case of diluted samples, multiply by the dilution factor.

6.1 Example of Calculation

The values shown below must be considered as an example and must not be used in place of experimental data.

Standard/Sample	O.D. 450 nm	TG	O.D. 405 nm	TG
Standard 0 ng/mL	0.020		0.007	
Standard 1 ng/mL	0.047		0.015	
Standard 3 ng/mL	0.127		0.042	
Standard 10 ng/mL	0.313		0.098	
Standard 30 ng/mL	0.863		0.373	
Standard 100 ng/mL	1.650		0.603	
Standard 300 ng/mL	> 3.000		1.488	
Sample 1	0.450	15.4 ng/mL	0.141	
Sample 2	2.240		0.829	166.4 ng/mL

6.2 Normal Values

The values reported below are indicative. We suggest that each laboratory establishes its own normal range.

Normal values have been established on 85 healthy subjects without thyroid disorders. Thyroglobulin levels were **lower than 40 ng/mL**.

6.3 Validation Criteria

Before proceeding to calculation of results, make sure the control serum concentration is included within the value described on the Quality Control Sheet.

7. PERFORMANCES OF THE ASSAY

7.1 Specificity

No cross reaction was observed with MIT, DIT, rT3, T3, T4, TSH, FSH and LH. This analytic method showed a cross-reactivity of 0.01% with human TBG.

7.2 Sensitivity

The sensitivity was calculated upon the calibration curve and expressed as the minimal dose showing a significant difference from the Zero Calibrator (mean value + 2 S.D.). This dose is **0.15 ng/mL**.

7.3 Precision

Precision was evaluated determining the repeatability and the reproducibility of the assay (intra- and inter-assay variability), on 3 sera at different TG concentrations.

Repeatability (Intra-assay)

Serum	Media (ng/mL)	±	D.S.	% C.V.	Replicates n.
1	152.41	±	5.71	3.75	10
2	15.14	±	0.26	1.71	10
3	1.69	±	0.10	6.14	10

Reproducibility (Inter-assay)

Serum	Media (ng/mL)	±	D.S.	% C.V.	Replicates n.
1	150.4	±	9.3	6.2	10
2	38.1	±	3.0	7.8	10
3	1.8	±	0.13	6.9	10

7.4 Accuracy

Accuracy of the method has been checked by the recovery and parallelism tests:

Recovery Test.

Known amounts of TG have been added to two normal sera and tested.

Added (ng/mL)	Measured (ng/mL)	Recovered (ng/mL)	Recovery %
S1	1.9	---	---
S1 + 12.5	14.9	13.0	104.0
S1 + 25	25.2	23.3	93.2
S1 + 50	50.7	48.8	97.6
S1 + 100	93.6	91.7	91.7
S1 + 200	195.00	193.1	96.6
S2	17.4	---	---
S2 + 12.5	27.0	9.6	76.8
S2 + 25	42.0	24.6	98.4
S2 + 50	65.0	47.6	95.2
S2 + 100	116.2	98.8	98.8
S2 + 200	205.1	187.7	93.9

Parallelism Test.

Two sera with high TG concentration were tested at different dilutions with the Zero Calibrator.

Dilution	Expected (ng/mL)	Measured (ng/mL)
S1 undiluted	---	179.50
1:2	89.75	84.75
1:4	44.88	47.57
1:8	22.44	28.46
S2 undiluted	---	25.69
1:2	12.85	15.05
1:4	6.42	6.97
1:8	3.21	3.83

7.5 Correlation

The Diametra TG ELISA Kit was compared to another commercially available TG assay (TG Zentech Irma Kit). 66 serum samples were analysed according in both test system. The linear regression curve is:

$$TG \text{ Zentech} = 1.029 * TG \text{ Diametra} + 2.069 \quad (R^2=0.952)$$

8. RECOVERY INTO THE SERUM SAMPLE

In a sample, the presence of anti-TG self-antibodies influences TG assay and thus can cause inaccurate results. Therefore, it is necessary to carry out a clinical recovery test to confirm the accuracy of the result. This test should not be considered as a method for discovering anti-TG antibodies.

Procedure:

Dilute 1/2 of the serum sample with the Recovery solution, e.g. 50 µL of sample + 50 µL of recovery solution. The TG concentration in the recovery solution is 50 ng/mL (SR).

Test the undiluted sample (S1) and the sample half diluted with the recovery solution according to the Assay scheme.

The percentage of recovered TG for a sample is calculated as follows:

$$\text{Recovery (\%)} = \frac{\text{ng/mL sample S2}}{(\text{ng/mL sample S1} + 50)/2} \times 100$$

Recoveries less than 75% or more than 120% indicate interferences from anti-TG self-antibodies.

12. LIMITS OF THE ASSAY

The results of the assay must be carefully interpreted and confirmed by clinical evaluations and further diagnostic tests.

BIBLIOGRAFIA-REFERENCES

1. Ruiz-Garcia J., Ruiz de Almodóvar J. M., Olea N., Pedraza V. Thyroglobulin level as a Predictive Factor of Tumoral Recurrence in Differentiated Thyroid Cancer. *J. Nuclear Medicine*, 1991, **32** (3), 395-398.
2. Pacini F., Pinchera A., Giani C., Grasso L., Doveri F., Baschieri L. Serum thyroglobulin in thyroid carcinoma and other thyroid disorders. *J. Endocrinol. Invest.*, 1980, **3**, 283-292.
3. Rubello D., Girelli M. E., Casara D., Piccolo M., Perin A., Busnardo B. Usefulness of the combined antithyroglobulin antibodies and thyroglobulin assay in the follow-up of patients with differentiated thyroid cancer. *J. Endocrinol. Invest.* 1990, **13**, 737-742.

4. Sheppard M. C. Serum Thyroglobulin and Thyroid Cancer. *Quarterly J. Medicine. New Series*, 1986, **59** (229), 429-433.
5. Tourmiaire J., Bernard M. H., Ayzac L., Nicolas M. H., Borner H. Dosage de la thyroglobuline sérique après lobectomie thyroïdienne totale unilatérale pour cancer thyroïdien différencié. *La Presse Médicale*, 1990, **19** (28), 1309-1312.
6. Pacini F., Elisei R., Fugazzola L., Pinchera A. Humoral Markers for Thyroid Carcinoma in Clinical Practice. *Diagn. Oncol.*, 1991, **1**, 194-196.
7. Chatherine Massart, Didier Maugendre. Importance of detection Method for Thyroglobulin Antibodies for the validity of Thiroglobulin measurements in sera from patients with Graves Disease. *Clin. Chem.* 2002, **48** (1), 108-107.

Ed 06/2010

DCM048-5

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Garibaldi, 18 –
20090 SEGRATE (MI)

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

Manufact: Via Giustozzi, 35/35a (già via Bartolomei) –
Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) ITALY.

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

IT
Spiegazione dei simboli









GB
Explanation of symbols

FR
Explication des symboles

ES
Significado de los simbolos

DE
Verwendete Symbole

PT
Explicação dos simbolos

	<p>DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p>		<p>DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por</p>
REF	<p>DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo</p>	 yyyy-mm	<p>DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção</p>
 yyyy-mm-dd	<p>DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p>		<p>DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico</p>
	<p>DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso</p>	LOT	<p>DE Chargenbezeichnung ES Codigo de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote</p>
 $\Sigma = xx$	<p>DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests GB Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes</p>	Cont.	<p>DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit</p>
 Max Min	<p>DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação</p>		

	DIA.METRA SRL	
Mod. PIS	PACKAGING INFORMATION SHEET	

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation