



DCM048-8
Ed. 09/2018

THYROGLOBULIN ELISA

per analisi di routine

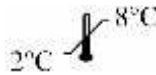
Determinazione della Tireoglobulina nel siero umano

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO048

DESTINAZIONE D'USO

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

Il kit Thyroglobulin ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. 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 colloidale 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.

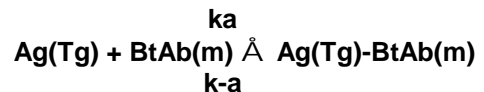
Controllo dei pazienti totalmente tiroidectomizzati.

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

I reagenti essenziali richiesti per un dosaggio immunoenzimometrico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (legati ad un enzima e immobilizzati), con epitopi diversi e distinti, in eccesso, e l'antigene nativo. In questa procedura, l'immobilizzazione avviene sulla superficie della micropiastre attraverso l'interazione della streptavidina coattata nei pozzetti e l'anticorpo monoclonale biotinilato esogeno anti Tireoglobulina. Quando l'anticorpo monoclonale biotinilato viene miscelato con un siero contenente l'antigene di Tireoglobulina, si forma un complesso antigene-anticorpo.

L'interazione è illustrata nella seguente equazione:



BtAb(m) = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

Ag(Tg) = antigene nativo (quantità variabile)

Ag(Tg)-BtAb(m) = complesso antigene-anticorpo (quantità variabile)

ka = tasso costante di associazione

k-a = tasso costante di dissociazione

Contemporaneamente, il complesso si deposita nel pozzetto attraverso la reazione ad alta affinità tra streptavidina ed anticorpo biotinilato. Questa interazione è illustrata di seguito:

**Ag(Tg)-BtAb(m) + Streptavidina C.W. →
Complesso immobilizzato**

Streptavidina C.W. = streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Complesso immobilizzato = complesso sandwich legato al pozzetto

Dopo un periodo di incubazione, la frazione anticorpo-antigene legata è separata dall'antigene non legato mediante uno step di lavaggio. Successivamente viene aggiunto un altro anticorpo (diretto contro un diverso epitopo) marcato con un enzima. Un'altra interazione si realizza per formare un complesso enzima-anticorpo-antigene-anticorpo biotinilato sulla superficie dei pozzetti.

L'enzima in eccesso viene lavato via attraverso una fase di lavaggio. Un substrato adatto viene quindi aggiunto per produrre una colorazione misurabile con l'uso di uno spettrofotometro per micropiastre.

L'attività enzimatica nei pozzetti è direttamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo. Utilizzando diversi calibratori sierici aventi concentrazione di antigene noto, può essere realizzata una curva dose-risposta da cui ricavare la concentrazione di antigene di un campione sconosciuto.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/4806-0
CAL1	REF DCE002/4807-0
CAL2	REF DCE002/4808-0
CAL3	REF DCE002/4809-0
CAL4	REF DCE002/4810-0
CAL5	REF DCE002/4811-0

2. Biotin Reagent (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo monoclonale anti Tg biotinilato
REF DCE019/4819-0

3. Enzyme Reagent (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo anti Tg IgG coniugato a perossidasi di rafano (HRP)
REF DCE002/4802-0

4. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

Micropiastro coattata con streptavidina
REF DCE002/4803-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 12 mL)

H₂O₂-TMB (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004/4804-0

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

Soluzione tamponata REF DCE006/4806-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile 2 mesi a 2-8°C..

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
 - Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
 - Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
 - Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
 - Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
 - Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
 - La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
 - Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- #### 5. PRECAUZIONI
- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.

- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀-C₅)

Non ci sono riferimenti internazionali riconosciuti per la Tireoglobulina. La tireoglobulina utilizzata nei calibratori a base sierica è una preparazione umana altamente purificata di Tg che è stata calibrata mediante misura gravimetrica contro il materiale di riferimento CRM 457 del "Community Bureau of Reference".

I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	2	10	40	100	250

Una volta aperti sono stabili 2 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

Il dosaggio può essere effettuato in siero umano.

Osservare le consuete precauzioni nella raccolta dei campioni derivati da sangue. Per un confronto approfondito per stabilire valori nella norma, è consigliabile utilizzare un campione di siero ottenuto la mattina a digiuno. Il sangue deve essere raccolto nelle apposite provette per prelievi, senza additivi o altro. Lasciare coagulare il sangue e centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule. I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Se i campioni non possono essere dosati entro questo tempo, possono essere conservati a -20°C fino a 30 giorni. Evitare l'uso di dispositivi contaminati. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testati in duplicato, sono necessari 0,100 mL di campione.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile 60 giorni a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione		50 µL	
Biotin Reagent	100 µL	100 µL	
<p>Agitare delicatamente la micropiastra per 20-30 secondi. Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili.</p> <p>Incubare a 37°C per 90 minuti.</p> <p>Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,350 mL di soluzione di lavaggio diluita.</p> <p>Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.</p> <p>Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.</p>			
Enzyme Reagent	100 µL	100 µL	
<p>Non agitare la micropiastra dopo l'aggiunta dell'Enzyme Reagent</p> <p>Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili.</p> <p>Incubare a 37°C per 60 minuti.</p> <p>Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,350 mL di soluzione di lavaggio diluita.</p> <p>Lavaggi: seguire le stesse indicazioni del punto precedente.</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Non agitare la micropiastra dopo l'aggiunta del TMB Substrate.</p> <p>Coprire la micropiastra con un foglio di carta o simili.</p> <p>Incubare per 15 minuti a temperatura ambiente (22-28°C).</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitare delicatamente la micropiastra.</p> <p>Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o azzerando con il Bianco entro 30 minuti.</p>			

7. CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli di ipotiroidie, eutiroidie e ipertiroidie per monitorare la performance del kit. Questi controlli devono essere trattati come sconosciuti e i valori determinati in ogni seduta.

I fogli di controllo qualità dovrebbero essere mantenuti per seguire le performance dei reagenti

forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare il trend. Ogni laboratorio dovrebbe scegliere i limiti di accettabilità delle performance del kit. Altri parametri da monitorare includono le intercette 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità inter-assay. Inoltre, l'assorbanza massima dovrebbe rispecchiare i valori delle sedute precedenti. Deviazioni significative dalle performance stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Usare reagenti freschi per determinare le ragioni delle variazioni.

8. CALCOLO DEI RISULTATI

Per determinare la concentrazione di tireoglobulina umana (Tg) in campioni incogniti è utilizzata una curva dose-risposta.

1. Registrare le assorbanze ottenute del lettore di micropiastre.
2. Riportare le assorbanze di ogni punto rispetto alla concentrazione corrispondente di Tg in ng/mL su carta millimetrata.
3. Tracciare la miglior curva passante per i punti.
4. Per determinare la concentrazione di Tg in un campione sconosciuto localizzare la OD media dei duplicati dei campioni incogniti sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva, e leggere la concentrazione (in ng/mL) sull'asse orizzontale del grafico. Nel seguente esempio, l'assorbanza media (0,424) interseca la curva dose-risposta a 25,2 ng/mL di concentrazione di Tg.

Nota: possono essere utilizzati anche software per l'analisi dei dati per saggi ELISA. Se viene utilizzato un software, accertarsi che sia stato validato.

8.1. Esempio di Calcolo

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

Calibratore /Campione	OD 450 nm	OD media	Valore Tg ng/mL
Cal 0	0.047	0.047	0
	0.047		
Cal 1	0.093	0.091	2
	0.090		
Cal 2	0.221	0.217	10
	0.214		
Cal 3	0.612	0.625	40
	0.634		
Cal 4	1.343	1.339	100
	1.335		
Cal 5	2.596	2.577	250
	2.557		
Sample	0.426	0.424	25.2
	0.422		

9. PARAMETRI DI CONTROLLO QUALITÀ

Affinché il test risulta essere considerato valido i criteri seguenti devono essere soddisfatti.

1. L'assorbanza (OD) del Calibratore 0 deve essere 0,10
2. L'assorbanza (OD) del Calibratore 5 deve essere 1.3
3. Rispettare i parametri di accettazione indicati nel Certificato di Analisi.

10. VALORI DI RIFERIMENTO

Sulla base dei dati clinici raccolti in conformità con la letteratura pubblicata è stato stabilito un range di normalità:

Tiroglobulina (ng/mL)	
Normale (adulti)	3.5 - 56 ng/mL

La Tiroglobulina è elevata nei pazienti con linfoma follicolare della tiroide e carcinoma papillare, adenoma della tiroide, tiroidite subacuta, tiroidite di Hashimoto e malattia di Graves. Bassi livelli di Tg sono un'indicazione di "tirotoxicosi factitia".

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

11. PARAMETRI CARATTERISTICI

11.1. Precisione

L'intra- e inter-assay sono stati determinati mediante analisi su tre differenti livelli di pool di sieri di controllo:

Intra assay				
Siero	Media ng/mL	SD	% CV	Replicati
1	6.2	0.41	6.6 %	22
2	64.4	2.23	3.6 %	22
3	194.1	8.17	4.2 %	22

Inter assay				
Siero	Media ng/mL	SD	% CV	Replicati
1	5.8	0.52	9.0 %	10
2	62.2	3.82	6.1 %	10
3	192.3	10.90	5.7 %	10

11.2. Sensibilità

La sensibilità analitica (detection limit) è stata calcolata determinando la variabilità del Calibratore 0 e considerando 2 deviazioni standard. La sensibilità del test è 0,44 ng/mL.

11.3. Accuratezza

Il kit Dia.Metra Thyroglobulin ELISA è stato comparato con un test radioimmunologico IRMA. Sono stati testati campioni biologici da pazienti sintomatici ed asintomatici.

La curva di regressione è:

$$Y = 0.908 * X + 2.55$$

$$(R^2=0.975)$$

11.4. Specificità

La cross-reattività del test Tiroglobulina Dia.Metra verso sostanze selezionate è stata determinata aggiungendo le sostanze interferenti ad una matrice sierica alle seguenti concentrazioni. Il cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra dose di sostanza interferente e dose di Tiroglobulina necessaria per produrre la stessa assorbanza.

Sostanza	Conc.	Cross-reattività
Thyroglobulin	100 ng/mL	100 %
Triiodothyronine	1000 ng/dL	ND
Thyroxine	1000 ng/mL	ND
TBG	100 ng/mL	ND

11.5. Effetto Hook

Alte concentrazioni di Tg non mostrano l'effetto gancio. I campioni con concentrazione superiore a 50.000 ng/mL hanno mostrato livelli estremamente alti di assorbimento.

12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

1. Beever K, Bradbury J, Phillips D, et al, "Highly sensitive assays of autoantibodies to Thyroglobulin and Thyroid Peroxidase", *Clin Chem*, **35**, 1949-1954 (1989).
2. Ladenson PW, "Optimal laboratory testing for diagnosis and monitoring of thyroid nodules, goiter, and thyroid cancer", *Clin Chem*, **42**, 183-187 (1996).
3. Mayo Medical Laboratories: test Catalog, Rochester, MN (1997).
4. Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyn M, "Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays", *Clin Chem*, **42**, 164-173 (1996).
5. Tietz N. Ed: *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3rd Ed. Philadelphia. Saunders (1995).
6. Surks, MI, Chopra, IJ, Mariash, CN, "American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders", *JAMA*, **263**, 1529-1532 (1990).
7. Ng, M., Rajna, A, Khalid, B, "Enzyme immunoassay for simultaneous measurements of autoantibodies against thyroglobulin and thyroid

- microsomes in serum”, *Clin Chem*, **33**, 2286-2288 (1987).
8. Spencer, CA, Takeuchi M, Kazarosyn M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA, et al, “Serum thyroglobulin autoantibodies; prevalence, influence on serum thyroglobulin measurements, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma”, *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1121-27 (1998).
 9. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S, Nicoloff JT, “Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurements”, *Thyroid*, **9**, 435-41 (1999).
 10. Schlumberger M, Baudin E, “Serum thyroglobulin determinations in the follow up of patients with differentiated thyroid carcinoma”, *Eur J. Endocrinol*, **138**, 249-252 (1998).

Ed. 09/2018

DCM048-8

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Example Version



DCM048-8
Ed. 09/2018

THYROGLOBULIN ELISA

for routine analysis

Determination of Thyroglobulin in human serum.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO048

INTENDED USE

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

Thyroglobulin ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. 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

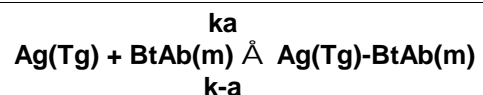
The use of circulating TG as an indicator of recurrent tumors (metastasis marker) has an established clinical value: the increase of Thyroglobulinaemia indicates the need to undergo further analysis for confirming the diagnosis. Interesting advantages can come from: a) a reduced use of scintigraphic 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

2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymometric assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilized), with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen. In this procedure, the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of the streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal Thyroglobulin antibody.

When monoclonal biotinylated antibody is mixed with a serum containing the Thyroglobulin antigen and the antibody, an antibody-antigen complex is formed.

The interaction is illustrated in the following equation:



BtAb(m) = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

Ag(Tg) = native antigen (variable quantity)

Ag(Tg)-BtAb(m) = antigen-antibody complex (variable quantity)

k_a = rate constant of association

k_{-a} = rate constant of dissociation

Simultaneously, the complex is deposited into the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:

Ag(Tg)-BtAb(m) + Streptavidin C.W. → Immobilized complex

Streptavidin C.W. = Streptavidin immobilized on well
Immobilized complex = sandwich complex bound to the well

After a suitable incubation period, the antibody-antigen bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. Another antibody (directed at a different epitope) labelled with an enzyme is added. Another interaction occurs to form and enzyme labelled antibody-antigen-biotinylated-antibody complex on the surface of the wells.

Excess enzyme is washed off via a wash step. A suitable substrate is added to produce color measurable with the use of a microplate spectrophotometer.

The enzyme activity in the well is directly proportional to the native antigen concentration. By utilizing several different serum references of known antigen concentration, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATIONS

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/4806-0
CAL1	REF DCE002/4807-0
CAL2	REF DCE002/4808-0
CAL3	REF DCE002/4809-0
CAL4	REF DCE002/4810-0
CAL5	REF DCE002/4811-0

2. Biotin Reagent (1 vial, 13 mL)

Biotinylated monoclonal anti Tg antibody
REF DCE019/4819-0

3. Enzyme Reagent (1 vial, 13 mL)

Anti Tg IgG antibody labeled with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/4802-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin
REF DCE002/4803-0

5. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004/4804-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0,15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005-0

7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

Buffered solution
REF DCE006/4806-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable 2 months at 2-8°C.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.

- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

There is no known, internationally accepted thyroglobulin standard available. The thyroglobulin used in the serum based calibrators is a highly purified human Tg preparation that is calibrated gravimetrically against the reference material obtained from Community Bureau of Reference CRM 457.

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	2	10	40	100	250

Once opened, the Calibrators are stable 2 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of the Sample

The assay can be performed in human serum. The usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed. For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained. The blood should be collected in a plain red-top venipuncture tube without additives or gel

barrier. Allow the blood to clot, centrifuge the specimen to separate the serum from the cells. Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid use of contaminated devices. Avoid repetitive freezing and thawing. When assayed in duplicate, 0.100 mL of the specimen is required.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 60 days at room temperature (22-28°C).

6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample		50 µL	
Biotin Reagent	100 µL	100 µL	

Swirl the microplate gently for 20-30 seconds to mix. Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate at 37°C for 90 minutes. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 0.350 mL of diluted wash solution.

Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

Enzyme Reagent	100 µL	100 µL	
<p>Do not shake the plate after enzyme addition. Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate at 37°C for 60 minutes. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 0.350 mL of diluted wash solution.</p> <p>Washing: follow the same indications of the previous point.</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Do not shake the plate after substrate addition. Cover with a plastic wrap or microplate cover. Incubate at room temperature (22-28°C) for 15 minutes in the dark.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm using a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 30 minutes.</p>			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. CALCULATION OF RESULTS

A dose response curve is used to ascertain the concentration of human thyroglobulin (Tg) in unknown specimens.

- Record the absorbance obtained from the printout of the microplate reader.
- Plot the absorbance for each duplicate serum reference versus the corresponding Tg concentration in ng/mL on linear graph paper (do not average the duplicates of the serum references before plotting)
- Draw the best fit curve through the plotted points.
- To determine the concentration of Tg for an unknown locate the average absorbance of the duplicates for each unknown on the vertical axis

of the graph, find the intersecting point on the curve, and read the concentration (in ng/mL) from the horizontal axis of the graph (the duplicates of the unknown may be averaged as indicated). In the following example, the average absorbance (0.424) intersects the dose response curve at 25.2 ng/mL Tg concentration.

Note: computer data reduction software designed for ELISA assays may also be used for the data reduction. If such software is utilized, the validation of the software should be ascertained.

8.1. Example of Calculation

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

Calibrator /Sample	OD 450 nm	Mean OD	Value Tg ng/mL
Cal 0	0.047	0.047	0
	0.047		
Cal 1	0.093	0.091	2
	0.090		
Cal 2	0.221	0.217	10
	0.214		
Cal 3	0.612	0.625	40
	0.634		
Cal 4	1.343	1.339	100
	1.335		
Cal 5	2.596	2.577	250
	2.557		
Sample	0.426	0.424	25.2
	0.422		

9. QUALITY CONTROL PARAMETERS

In order for the assay results to be considered valid the following criteria should be met.

- The absorbance (OD) of Calibrator 0 should be 0.10.
- The absorbance (OD) of Calibrator 5 should be 1.3.
- Respect the assigned ranges indicated on the Certificate of Analysis.

10. REFERENCE VALUES

Based on clinical data gathered in concordance with the published literature a normal range was established:

Thyroglobulin (ng/mL)	
Normal (adult)	3.5 - 56 ng/mL

Thyroglobulin is found to be elevated in patients with thyroid follicular and papillary carcinoma, thyroid adenoma, subacute thyroiditis, Hashimoto's thyroiditis and graves' disease. Low levels of Tg are an indication of thyrotoxicosis factitia.

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent

on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

11.1. Precision

The intra and inter assay precisions were determined by analyses on three different levels of pool control sera:

Intra assay				
Serum	Mean ng/mL	SD	% CV	Replicates
1	6.2	0.41	6.6 %	22
2	64.4	2.23	3.6 %	22
3	194.1	8.17	4.2 %	22

Inter assay				
Serum	Mean ng/mL	SD	% CV	Replicates
1	5.8	0.52	9.0 %	10
2	62.2	3.82	6.1 %	10
3	192.3	10.90	5.7 %	10

11.2. Sensitivity

The analytical sensitivity (detection limit) was calculated by determining the variability of the 0 ng/mL serum calibrator and using 2 standard deviation (95% certainty) statistics to calculate the minimum dose. The assay sensitivity was found to be 0.44 ng/mL.

11.3. Accuracy

Dia.Metra Thyroglobulin ELISA assay was compared with a reference coated tube radioimmunoassay (IRMA). Biological specimens from population (symptomatic and asymptomatic) were used.

The linear regression curve is:

$$Y = 0.908 \cdot X + 2.55$$

$$(R^2=0.975)$$

11.4. Specificity

The cross-reactivity of Dia.Metra Thyroglobulin assay to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at the following concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of Thyroglobulin needed to produce the same absorbance.

Substance	Conc.	Cross-reactivity
Thyroglobulin	100 ng/mL	100 %
Triiodothyronine	1000 ng/dL	ND
Thyroxine	1000 ng/mL	ND
TBG	100 ng/mL	ND

11.5. High Dose Effect

Since the assay is sequential in design, high concentrations of Tg do not show the hook effect. Samples with concentration over 50000 ng/mL demonstrated extremely high levels of absorbance.

12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Beever K, Bradbury J, Phillips D, et al, "Highly sensitive assays of autoantibodies to Thyroglobulin and Thyroid Peroxidase", *Clin Chem*, **35**, 1949-1954 (1989).
2. Ladenson PW, "Optimal laboratory testing for diagnosis and monitoring of thyroid nodules, goiter, and thyroid cancer", *Clin Chem*, **42**, 183-187 (1996).
3. Mayo Medical Laboratories: test Catalog, Rochester, MN (1997).
4. Spencer CA, Takeucho M, Kazarosyn M, "Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays", *Clin Chem*, **42**, 164-173 (1996).
5. Tietz N. Ed: *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3rd Ed. Philadelphia. Saunders (1995).
6. Surks, MI, Chopra, IJ, Mariash, CN, "American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders", *JAMA*, **263**, 1529-1532 (1990).
7. Ng, M., Rajna, A, Khalid, B, "Enzyme immunoassay for simultaneous measurements of autoantibodies against thyroglobulin and thyroid microsomes in serum", *Clin Chem*, **33**, 2286-2288 (1987).
8. Spencer, CA, Takeucho M, Kazarosyn M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA, et al, "Serum thyroglobulin autoantibodies; prevalence, influence on serum thyroglobulin measurements, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma", *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1121-27 (1998).
9. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S, Nicoloff JT, "Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurements", *Thyroid*, **9**, 435-41 (1999).
10. Schlumberger M, Baudin E, "Serum thyroglobulin determinations in the follow up of patients with differentiated thyroid carcinoma", *Eur J. Endocrinol*, **138**, 249-252 (1998).

Ed. 09/2018

DCM048-8

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

Example Version



DCM048-8
Ed. 09/2018

THYROGLOBULIN ELISA

para análisis de rutina

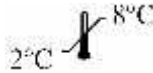
Determinación de la tiroglobulina en suero humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO048

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de tiroglobulina en suero humano.

El kit Thyroglobulin ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente

1. APLICACIONES CLÍNICAS

La tiroglobulina (TG), glicoproteína de peso molecular de 660.000 dalton aproximadamente, es la yodoproteína principal de la tiroides y el componente más importante del coloide folicular. La tiroglobulina constituye la forma en que se depositan las hormonas activas, T3 y T4, y sus precursores inmediatos dentro de la glándula tiroides, MIT y DIT. Las aplicaciones clínicas de la determinación de TG parecen derivarse de su especificidad para la tiroides y las células relacionadas con la tiroides.

La determinación de TG puede usarse como apoyo de análisis gammagráficos y otras técnicas para el estudio de la patogénesis, en la formulación de un diagnóstico y en el análisis del curso de los trastornos de la tiroides.

En caso de hipotiroidismo por agenesia tiroidea, la TG es indetectable antes y después de la terapia sustitutiva con L-tiroxina. Si el hipotiroidismo es de tipo secundario de bocio por dishormogénesis o de tiroides ectópica, la TG presenta niveles normales o elevados. Los niveles circulantes de TG tienden a aumentar en una variedad de enfermedades tiroideas como el bocio tóxico y no tóxico, la tiroiditis subaguda, enfermedad de Basedow y carcinoma. La determinación de la TG es de interés potencial en la enfermedad de Basedow como índice de normalización del estado hipertiroideo en pacientes tratados con fármacos anti-tiroideos. Aplicaciones muy prometedoras, relacionadas con la capacidad de los tejidos tumorales tiroideos de concentrar el yodo y sintetizar la TG como la tiroides normal, conciernen al campo de la oncología tiroidea, en particular al carcinoma diferenciado de tiroides. En principio, la determinación de TG se puede utilizar como se indica a continuación

Diagnóstico preoperatorio de tumor tiroideo.

Esta aplicación no permite el diagnóstico diferencial del tumor debido a la superposición de los valores de TG observados en los nódulos malignos y benignos.

Seguimiento postoperatorio

Los niveles elevados de TG durante un tiempo prolongado sugieren la presencia de carcinoma tiroideo residual y/o metastásico en pacientes tratados quirúrgicamente o con radioterapia.

Control de los pacientes totalmente tiroidectomizados.

El uso de la TG circulante como indicador de tumor recurrente (marcador de metástasis) tiene un valor clínico comprobado: El aumento de la tiroglobulinemia indica la necesidad de someterse a análisis posteriores para la confirmación del diagnóstico. Se pueden obtener ventajas interesantes a) del uso reducido de técnicas gammagráficas de diagnóstico, cuyo uso requiere la suspensión periódica de la terapia de sustitución y la exposición frecuente a la radiación, b) y de la obtención de la información de diagnóstico a través de la gammagrafía.

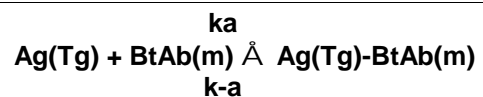
2. PRINCIPIO

Los reactivos esenciales requeridos para el ensayo son:

Anticuerpos de alta afinidad (conjugados a la enzima e ligados al pocillo) con epitopes distintos, en exceso; y el antígeno nativo.

En este ensayo la captura sobre la superficie de la microplaca se da por la interacción de la estreptavidina ligada al pocillo y el anticuerpo monoclonal biotilnado anti Tiroglobulina. Cuando el anticuerpo monoclonal biotilnado se mezcla con un suero conteniendo la Tiroglobulina, se forma un complejo antígeno/anticuerpo-biotilnado.

La interacción se describe con la siguiente ecuación:



BtAb(m)= Anticuerpo monoclonal biotilado (cantidad en exceso)

Ag(Tg)= Antígeno nativo (cantidad variable)

Ag(Tg)-BtAb(m)= complejo antígeno-anticuerpo

Ka= constante de asociación

k-a= constante de disociación

Contemporáneamente el complejo se deposita en el pocillo debido a la reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y el anticuerpo biotilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

Ag(Tg)-BtAb(m) + Estreptavidina C.W. → Complejo inmovilizado

Estreptavidina C.W.= estreptavidina inmovilizada sobre el pocillo

Complejo inmovilizado= complejo sándwich ligado al pocillo

Después de la incubación el material sin reaccionar se elimina por medio de un lavado, se añade luego un segundo anticuerpo, marcado con la enzima, dirigido hacia un epítopo diferente de la Tiroglobulina,. Se produce un complejo formado por Enzima-Anticuerpo/Antígeno/Anticuerpo-biotina/estreptavidina-pocillo. Un segundo lavado elimina los reactivos que no hayan reaccionado. Se añade sustrato y se produce una coloración que se mide con un lector ELISA. La coloración es directamente proporcional a la concentración de antígeno presente. Utilizando calibradores de concentración conocida se prepara una curva dosis-respuesta con la cual se calcula la concentración de las muestras desconocidas.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0 **REF DCE002/4806-0**

CAL1 **REF DCE002/4807-0**

CAL2 **REF DCE002/4808-0**

CAL3 **REF DCE002/4809-0**

CAL4 **REF DCE002/4810-0**

CAL5 **REF DCE002/4811-0**

2. Biotin Reagent (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo monoclonal anti Tg biotilado

REF DCE019/4819-0

3. Enzyme Reagent (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo monoclonal anti Tg IgG conjugado con

peroxidasa de rábano (HRP) **REF DCE002/4802-0**

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Microplaca recubierta con con estreptavidina

REF DCE002/4803-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 12 mL)

H₂O₂-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004/4804-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

Solución tamponada

REF DCE006/4806-0

3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3. Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar todos los reactivos a 2-8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierto el kit es funcional durante dos meses si almacenado a la temperatura indicada (2-8°C).

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los reactivos deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.

- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1.Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al CRM 457 y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/mL	0	2	10	40	100	250

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 2 meses conservados a 2-8°C.

6.2.Preparación de las muestras

El ensayo se efectúa en suero humano, observar las precauciones usuales para la toma de muestra. Es aconsejable utilizar muestras obtenidas en la mañana y en ayunas, la muestra debe recogerse en tubos apósitos sin aditivos. Dejar coagular la sangre y centrifugar para separar el suero, este puede conservarse refrigerado 2-8°C durante un periodo máximo de 5 días, para periodos mayores congelar a -20°C (máximo 30 días).

Utilice dispositivos nuevos y no contaminados, evítense repetidos ciclos de congelación-descongelación. Si realiza ensayos en duplicados se requiere un mínimo de 0.100mL de muestra.

6.3.Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 60 días.

6.4.Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestra		50 µL	
Biotin Reagent	100 µL	100 µL	
<p>Agite delicadamente la microplaca durante 20-30 segundos. Cubra la microplaca con una hoja de papel. Incubar a 37°C durante 90 minutos. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Enzyme Reagent	100 µL	100 µL	
<p>No agite la microplaca después de haber añadido el Enzyme Reagent. Cubra la microplaca con una hoja de papel. Incubar a 37°C durante 60 minutos. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,350 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Lavados: siga las mismas instrucciones del punto anterior.</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>No agite la microplaca después de haber añadido el TMB Substrate. Cubra la microplaca con una hoja de papel. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente (22-28°C).</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (OD) a 450nm utilice una segunda lectura de referencia a 620-630nm o bien reste el valor OD del blanco a cada muestra. Leer entre 30 minutos.</p>			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de hipotiroidismo, eutiroidismo hipertiroidismo para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para la reproducibilidad interensayo.

Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Para determinar la concentración de Tiroglobulina en las muestras se utiliza una curva dosis-respuesta.

1. Apunte las absorbancias obtenidas
2. Reporte las absorbancias obtenidas de cada punto versus su concentración en ng/mL en papel milimetrado.
3. Trace la mejor curva entre los puntos.
4. Para determinar la concentración de una muestra, localice la OD obtenida (eje "y") encuentre el punto de intercepción sobre la curva y lea la concentración obtenida (eje "x")

En el ejemplo a continuación la OD media (0.424) de una muestra interseca la curva dosis-respuesta a 25.2 ng/mL de concentración de Tg.

Nota: puede utilizarse distintos software de cálculo para el análisis de los resultados, queda bajo responsabilidad del usuario asegurarse que el software en uso haya sido validado.

8.1. Ejemplo de cálculo

Los valores indicados a continuación deben considerarse únicamente como ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos experimentales.

Calibrador /Muestra	OD 450 nm	OD promedia	Tg (ng/mL)
Cal 0	0.047	0.047	0
	0.047		
Cal 1	0.093	0.091	2
	0.090		
Cal 2	0.221	0.217	10
	0.214		
Cal 3	0.612	0.625	40
	0.634		
Cal 4	1.343	1.339	100
	1.335		
Cal 5	2.596	2.577	250
	2.557		

Muestra	0.426	0.424	25.2
	0.422		

9. CONTROL DE CALIDAD

Para que el ensayo se considere valido se deben satisfacer los siguientes criterios:

1. La absorbancia (OD) del Calibrador 0 debe ser 0.10.
2. La absorbancia (OD) del Calibrador 5 debe ser 1.30
3. Se deben cumplir los parámetros de aceptación indicados en el Certificado de Analisis.

10. VALORES NORMALES

Tomando en cuenta los datos clínicos de conformidad a la literatura publicada, se ha establecido el siguiente rango de normalidad:

Tiroglobulina (ng/mL)	
Normal (adultos)	3.5 - 56 ng/mL

La tiroglobulina se eleva en pacientes con linfoma folicular de la tiroide, en el carcinoma papilar, adenoma de la tiroide, tiroiditis subaguda, tiroiditis de Hashimoto y en la enfermedad de Graves. Niveles bajos de Tg son una indicación de "tirotoxicosis ficticia"

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

11. CARACTERÍSTICAS METODOLÓGICAS

11.1. Precisión

La precisión se ha evaluado midiendo la repetibilidad y la reproducibilidad (variabilidad intraensayo e interensayo) en 3 sueros con concentraciones distintas de TG.

Intra-ensayo				
Muestra	Promedio ng/mL	SD	% CV	Replicados
1	6.2	0.41	6.6 %	22
2	64.4	2.23	3.6 %	22
3	194.1	8.17	4.2 %	22

Inter-ensayo				
Muestra	Promedio ng/mL	SD	% CV	Replicados
1	5.8	0.52	9.0 %	10
2	62.2	3.82	6.1 %	10
3	192.3	10.90	5.7 %	10

11.2. Sensibilidad

La sensibilidad se ha calculado sobre la curva de calibración y se expresa como dosis mínima significativamente distinguible de la respuesta del Calibrador cero (valor medio + 2 S.D.). Esta dosis ha resultado ser igual a 0,44 ng/mL.

11.3. Correlación

El kit Thyroglobulin ELISA Dia.Metra se ha comparado con un kit IRMA. Han sido ensayados muestras biológicas de pacientes sintomáticos e asintomáticos.

La curva de regresión es:

$$Y = 0,908 \cdot X + 2,55 \quad (R^2=0,975)$$

11.4. Especificidad

La reactividad cruzada del test Tiroglobulina Dia.Metra hacia sustancias seleccionadas ha sido determinada añadiendo compuestos interferentes a una matriz sérica a las siguientes concentraciones. La reactividad cruzada se calculó analizando la relación entre la dosis de sustancia interferente y la dosis de Tiroglobulina necesaria para producir la misma absorbancia.

Sustancia	Conc.	React. cruzada
Thyroglobulin	100 ng/mL	100 %
Triiodothyronine	1000 ng/dL	ND
Thyroxine	1000 ng/mL	ND
TBG	100 ng/mL	ND

11.5. Efecto Hook

Concentraciones altas de Tg no demuestran el efecto gancho, las muestra con concentraciones superiores a 50000 ng/mL muestran niveles de absorbancia extremadamente altos.

12. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Los resultados del ensayo deben interpretarse con cautela y confirmarse mediante evaluaciones clínicas y otras pruebas de diagnóstico

BIBLIOGRAFÍA

1. Beever K, Bradbury J, Phillips D, et al, "Highly sensitive assays of autoantibodies to Thyroglobulin and Thyroid Peroxidase", *Clin Chem*, **35**, 1949-1954 (1989).
2. Ladenson PW, "Optimal laboratory testing for diagnosis and monitoring of thyroid nodules, goiter, and thyroid cancer", *Clin Chem*, **42**, 183-187 (1996).
3. Mayo Medical Laboratories: test Catalog, Rochester, MN (1997).
4. Spencer CA, Takeucho M, Kazarosyn M, "Current status and performance goals for serum thyroglobulin assays", *Clin Chem*, **42**, 164-173 (1996).
5. Tietz N. Ed: *Clinical Guide to Laboratory Tests*. 3rd Ed. Philadelphia. Saunders (1995).
6. Surks, MI, Chopra, IJ, Mariash, CN, "American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid disorders", *JAMA*, **263**, 1529-1532 (1990).
7. Ng, M., Rajna, A, Khalid, B, "Enzyme immunoassay for simultaneous measurements of autoantibodies against thyroglobulin and thyroid microsomes in serum", *Clin Chem*, **33**, 2286-2288 (1987).
8. Spencer, CA, Takeucho M, Kazarosyn M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA, et al, "Serum thyroglobulin autoantibodies; prevalence, influence on serum thyroglobulin measurements, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma", *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 1121-27 (1998).
9. Spencer CA, LoPresti JS, Fatemi S, Nicoloff JT, "Detection of residual and recurrent differentiated thyroid carcinoma by serum thyroglobulin measurements", *Thyroid*, **9**, 435-41 (1999).
10. Schlumberger M, Baudin E, "Serum thyroglobulin determinations in the follow up of patients with differentiated thyroid carcinoma", *Eur J. Endocrinol*, **138**, 249-252 (1998).

Ed. 09/2018

DCM048-8

Dia.Metra S.r.l.

Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	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		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement GB Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	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)		DE Biogefährdung ES Riesco biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	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	LOT	DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	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	CONT	DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação	REF	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil GB Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		

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 temperatura 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

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs