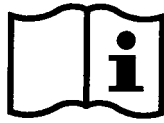


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



Thyroglobulin (hTg) IRMA



DE20100



100 tubes



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.com

Content / Inhaltsverzeichnis

Introduction	3
Principle of method	3
Contents of the kit.....	3
Materials, tools and equipment required	4
Specimen collection and storage	4
Preparation of reagents, storage	4
Assay procedure.....	4
Interpretation of results:.....	5
Calculation of results	6
Characterization of assay	7
Procedural notes	8
Additional information	8
Precaution.....	9
Storage and shelf life.....	9
Einleitung	10
Testprinzip	10
Mitgelieferte Reagenzien.....	10
Zusätzlich benötigtes Material	11
Probensammlung und Lagerung	11
Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung	11
Assaydurchführung.....	11
Interpretation der Ergebnisse	12
Berechnung der Ergebnisse	13
Assay Charakteristika	14
Hinweise zur Durchführung	15
Zusätzliche Informationen.....	16
Warnhinweise	16
Lagerung und Haltbarkeit	16
Literature/Literatur	17
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	20

The hTg [I-125] IRMA system provides direct quantitative in vitro determination of human thyroglobulin (hTg) in human serum. hTg can be assayed in the range of 0.25-250 ng/mL using 100 µl serum samples.

Introduction

The Thyroglobulin is a iodoglycoprotein consisting of heterogeneous molecules, the composition of which is in part depending on the degree of iodination. The prevailing molecular form is 660 kDa (dimeric form, the two subunits, linked by noncovalent bounds), but both larger and smaller molecular forms exist in the thyroid gland. Thyroglobulin is the site of synthesis and storage of thyroid hormones produced by the thyroid gland. Thyroglobulin is synthesized and stored in thyroid follicles and some of the nonenzymatically digested protein is released into the circulation upon stimulation with thyrotropin (TSH). Circulating Thyroglobulin can be elevated in different thyroid disorders, such as Grave's multinodular goitre, benign thyroid adenoma and acute phase thyroiditis.

The determination of Thyroglobulin by immunoassay methods is a useful and well accepted tool in monitoring differentiated thyroid cancer patients after total thyroidectomy with or without radioiodine ablation.

The sensitivity of the present hTg IRMA system makes it suitable for the measurement of subnormal Thyroglobulin levels, which is an early and reliable marker of tumour recurrence.

Principle of method

The technology uses two high affinity monoclonal antibodies in an immunoradiometric assay (IRMA) system.

The ¹²⁵I labelled signal-antibody binds to an epitope of the hTg molecule spatially different from that recognised by the biotin-capture- antibody. The two antibodies react simultaneously with the antigen present in standards or samples, which leads to the formation of a capture antibody - antigen - signal antibody complex, also referred to as a "sandwich".

During an overnight incubation period the immuno-complex is immobilized to the reactive surface of streptavidin coated test tubes. Reaction mixture is then discarded, test tubes washed exhaustively, and the radioactivity is measured in a gamma counter.

The concentration of antigen is directly proportional to the radioactivity measured in test tubes. By constructing a calibration curve plotting binding values against a series of calibrators containing known amount of hTg, the unknown concentration of hTg in patient samples can be determined.

Contents of the kit

1. **TRACER** **I-125** 1 bottle TRACER (21 ml), ready to use, containing about 980 kBq ¹²⁵I-anti-hTg and capture anti-hTg in buffer with red dye 0.1 % NaN₃.
2. **CAL** **1** - **6** 6 vials STANDARD (6 x 1.0 ml), containing (S1-S6) 0.3, 1.0, 4.0, 20, 100, 250 ng/ml hTg (calibrated to BCR CRM457) in equine-swine serum with 0.1% NaN₃.
3. **CONTROL** **1** / **2** 2 vials CONTROL SERUM (2 x 1.0 ml), in equine-swine serum with 0.1% NaN₃. The concentration of the control sera is specified in the quality certificate enclosed.
4. **DIL** SERUM DILUENT, (5.0 ml), containing equine-swine serum and 0.1% NaN₃. Serum diluent is also zero calibrator.
5. **RECOV** RECOVERY SERUM, (1.0 ml), containing human serum and 0.1% NaN₃. The concentration of the recovery serum is specified in the quality certificate enclosed.
6. **SORB** **CT** 2 boxes COATED TUBE, Ready to use. 2x50 reactive test tubes, 12x75 mm, packed in plastic boxes.
7. **WASH** **SOLN** **35x** 1 bottle WASH BUFFER CONCENTRATE (20 ml), containing 0.2 % NaN₃. See *Preparation of reagents*.

Preparation of reagents.

Quality certificate

Pack leaflet

Materials, tools and equipment required

Test tube rack, precision pipettes with disposable tips (10, 100, 200 and 2000 µL), vortex mixer, plastic foil, adsorbent tissue, gamma counter

Recommended tools and equipment

repeating pipettes (e.g., Eppendorf or else), dispenser with 1-L reservoir (instead of the 2-mL pipette)

Specimen collection and storage

Serum samples can be prepared according to common procedures used routinely in clinical laboratory practice. Samples can be stored at 2-8°C if the assay is carried out within 24 hours, otherwise aliquots should be prepared and stored deep frozen (-20°C) up to 3 months. Frozen samples should be thawed and thoroughly mixed before assaying. Repeated freezing and thawing should be avoided. Do not use lipemic, haemolyzed or turbid specimens. Samples with a hTg concentration higher than 250 ng/mL should be diluted with the serum diluent included in the kit and re-assayed.

Preparation of reagents, storage

Add the wash buffer concentrate (20 mL) to 700 mL distilled water to obtain 720 mL wash solution. Upon dilution store at 2-8°C until expiry date.

Store the rest of reagents between 2-8°C after opening. At this temperature each reagent is stable until expiry date. The actual expiry date is given on the package label and in the quality certificate.

Assay procedure

(For a quick guide, refer to Table 1.)

1. Equilibrate reagents and samples to room temperature before use.
2. Label coated tubes in duplicate for each standard (S1-S6), control serum (CI, CII), serum diluent (D) as zero calibrator and serum samples (Sx).
3. Homogenize all reagents and samples by gentle mixing. Avoid foaming.
4. Pipette 100 µL of standards into the standard tubes (S1-S6), 100 µL control into control tubes (CI, CII), 100µL sample into sample (Sx) tubes and 100µL serum diluent into the serum diluent tubes (D) as zero calibrator. Use rack to hold the tubes. Do not touch or scratch the inner bottom of the tubes with pipette tip.
5. Pipette 200 µL of tracer into each tube.
6. Gently vortex all tubes. Seal all tubes with a plastic foil.
7. Incubate tubes for 15-24 hours at RT (room temperature).
8. Add 2.0 mL diluted wash buffer to each tube and decant the supernatant from all tubes by the inversion of the rack. In the upside-down position, place the rack on an absorbent paper for 2 minutes.
9. Return the tube-rack to an upright position, and repeat Step-9 two times more
10. Count each tube for at least 60 seconds in a gamma counter.
11. Calculate the hTg concentrations of the samples as described in calculation of results or use special software.

Table 1. Assay Protocol, Pipetting Guide (all volumes in microlitres)

**Recovery measurement is optional*

Tube Reagents	Total (T)	Serum diluent (D)	Standard (S1-S6)	Sample (Sx)	Control serum (CI-CII)	Recovery tubes* (Rx)	Recovery reference tubes* (DR)
Standard			100				
Sample				100		100	
Control serum					100		
Recovery serum						10	10
Serum diluent		100					100
Tracer	200	200	200	200	200	200	200
Incubate tubes for 15-24 hours at RT							
Wash buffer		2000	2000	2000	2000	2000	2000
Decant the fluid and blot on filter paper							
Repeat the washing step two times							
Counting radioactivity (60 sec/tube)							
Calculate the results							

Interpretation of results:

When interpreting the test results, the possible presence of interfering Thyroglobulin autoantibodies in the sample should be ruled out. The validity of serum Thyroglobulin results should be verified preferably by the determination of anti-TG in the sample¹⁵ (*for example using the RK-8CT Anti-hTG [I-125] RIA kit*) and in some cases recovery tests as described below may also prove to be useful.

The recovery test should be carried out as described in the assay procedure. The concentration of the recovery serum should be checked with serum diluent (recovery reference tubes (DR)).

1. Label coated tubes in duplicate for recovery reference (DR), and recovery serum (Rx).
2. Pipette 10µl recovery serum into the recovery reference tubes (DR) and into the sample recovery tubes (Rx).
3. Pipette 100µl sample into recovery tubes (Rx) and 100µl serum diluent into the recovery reference tubes (DR).
4. Same as assay procedure 5-11.

Calculate Recovery (in%) in the serum sample:

$$\frac{\text{ng hTg/mL Rx} - \text{ng hTg/mL Sx}}{\text{ng hTg/mL DR}} \times 100 = \% \text{ recovery}$$

Recoveries between 70% and 130% are considered valid. Levels of <70% or >130% are due to interference and the hTg level of the relevant original sample is considered invalid.

Calculation of results

The calculation is illustrated using representative data. The assay data collected should be similar to those shown in Table 2.

Calculate the average count per minute (CPM) for each pair of assay tubes

Calculate the normalized percent binding for each standard, control

and sample respectively by using the following equation:

$$B/T(\%) = \frac{S_{1-6} / C / Rx \text{ (cpm)} - D}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Using semi-logarithmic graph paper plot B/T (%) for each standard versus the corresponding concentration of hTg.

Determine the hTg concentration of the unknown samples by interpolation from the standard curve. Do not extrapolate values beyond the standard curve range.

Out of fitting programs applied for computerized data processing logit-log, or spline fittings can be used.

Automated data processing systems are also available.

Table 2. Typical assay data

Tubes	hTg ng/mL	Mean cpm (n = 20)	B/T%	hTg ng/mL
T		293137		
D (NSB)	0	110	0.04	
S0.3	0.3	398	0.13	
S1,0	1.0	916	0.31	
S4,0	4.0	2648	0.89	
S20	20	10154	3.43	
S100	100	48363	16.33	
S250	250	107279	36.23	
CI		1457	0.49	1.9
CII		36295	12.26	77.9

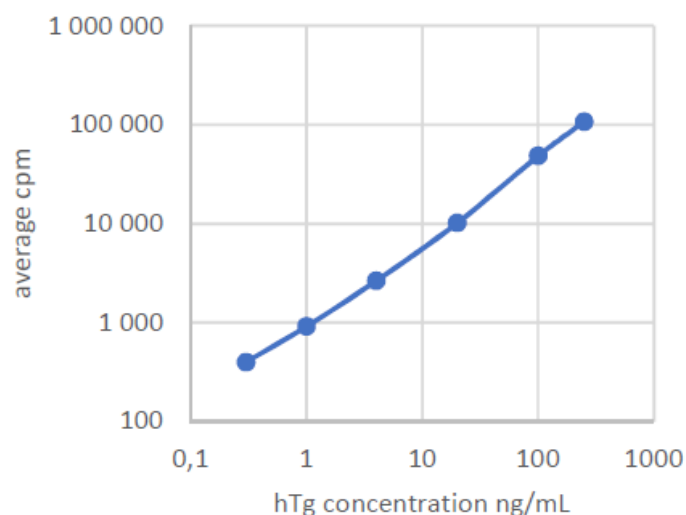


Figure 1: A typical standard curve
(Do not use to calculate unknown samples)

Characterization of assaySensitivity

Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) and Limit of Quantitation (LoQ) were determined consistent with the guidelines in CLSI document EP17-A2.

Limit of Blank (LoB): 0.025 ng/mL

Limit of Detection (LoD): 0.10 ng/mL

Limit of Quantitation (LoQ): 0.20 ng/mL

Hook effect

There is no high dose hook effect up to an hTg concentration of 20000 ng/mL.

Linearity

The linearity was evaluated according to CLSI EP06-A guideline, using the polynomial method. The method was found linear from 0.1 ng/mL to 274 ng/mL, within 10% error in this interval.

Recovery – addition test

The recovery test was performed as specified before in this instruction for use. 92 individual human serum samples, previously tested negative for anti-hTg, were spiked with the recovery serum included in the kit. The base hTg concentration of the samples (Sx) and the hTg concentration of the spiked samples (Rx) were measured. The expected increase (DR) is that measured when spiking the Serum Diluent (with zero hTg concentration) with the Recovery Serum. The Recovery % is calculated as percentage of measured increase per expected increase of hTg in each spiked sample:

$$\text{Recovery \%} = \frac{Rx - Sx}{DR} \times 100$$

The average recovery was 109.9%. The highest result is 119% and the lowest result is 93.1%.

PrecisionSingle-site precision

Single-site precision was calculated using 5 serum pools at different hTg concentrations, according to CLSI document EP05-A3. Samples were measured in twenty testing days, two runs per day and using two replicates per run.

Sample	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-laboratory Precision	
		SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	0.27	0.03	10.83	0.04	15.54
Pool 2	5.43	0.23	4.19	0.25	4.67
Pool 3	20.18	0.47	2.31	0.65	3.22
Pool 4	52.89	0.92	1.73	1.39	2.62
Pool 5	136.55	4.41	3.23	4.63	3.39

Multisite precision

Multisite precision was calculated using 5 serum pools at different hTg concentrations, according to CLSI document EP05-A3. Samples were measured in three different sites, at each site five runs were performed, one run per day and using five replicates per run.

Sample	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-laboratory Precision		Reproducibility	
		SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	0.258	0.032	12.46	0.036	13.92	0.039	14.95
Pool 2	5.075	0.334	6.59	0.344	6.78	0.366	7.21
Pool 3	18.86	0.977	5.18	1.003	5.32	1.017	5.39
Pool 4	49.58	1.892	3.82	2.108	4.25	2.128	4.29
Pool 5	129.84	6.554	5.05	6.886	5.30	6.941	5.35

Reference Interval

Reference Interval was established following the EP28-A3c CLSI Guideline, using the non-parametric method. 484 presumably healthy blood donors were evaluated.

The central 95% reference limits obtained (with 90% confidence intervals) is from **0.3 ng/mL** (0.22 – 0.51 ng/mL) **to 50 ng/mL** (40.6 – 69.7 ng/mL).

It is recommended that each laboratory determine a reference range for healthy persons for its own patient population, since this may vary in different laboratories or regions.

Interference:

Interference testing was performed according to CLSI document EP7- A2. Predefined acceptable interference threshold: <15%. Interference could not be detected for endogenous substances and drugs up to the following concentration:

Bilirubin	684 µmol/L
Triglycerides	16.94 mmol/L
Haemoglobin	10 g/L
Rheumatoid Factor	400 IU/mL
Biotin	100 ng/mL
Acetaminophen	15.6 mg/dL
Acetylsalicylic acid	3.0 mg/dL
Ascorbic acid	5.25 mg/dL
Diclofenac	2.4 mg/dL
Ibuprofen	21.9 mg/dL
Levothyroxine	10 µg/mL
hTSH	1.5 µg/mL
Sorafenib	500 µg/mL
Lenvatinib	15 µg/mL

Procedural notes

1) **Source of error!** Reactive test tubes packed in plastic boxes are not marked individually. Care should be taken of not mixing them with common test tubes. To minimize this risk, never take more tubes than needed out of plastic box, and put those left after work back to the box. It is recommended to label assay tubes by a marker pen.

2) **Addition of wash buffer.** For the addition of wash buffer, the use of a common laboratory dispenser equipped with a 1-L glass bottle, and a flexible outlet tubing end is recommended. In lack of this tool a large-volume syringe attached to a repeating pipette can be used.

Additional information

Components from various lots or from kits of different manufacturers should not be mixed or interchanged.

Precaution

Radioactivity

This product contains radioactive material. It is the responsibility of the user to ensure that local regulations or code of practice related to the handling of radioactive materials are satisfied.

Biohazard

Human blood products used in the kit have been obtained from healthy human donors. They were tested individually by using approved methods (EIA, enzyme immunoassay), and were found to be negative, for the presence of both Human Immunodeficiency Virus antibody (Anti-HIV-1, 2), Hepatitis-C antibody (anti-HCV), Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) and Treponema Antibody.

Care should always be taken when handling human specimens to be tested with diagnostic kits. Even if the subject has been tested, no method can offer complete assurance that infectious agents are *absent. Human blood samples should therefore be handled as potentially infectious materials.*

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious materials.

Chemical hazard

Components contain sodium azide as an antimicrobial agent. Dispose of waste by flushing with copious amount of water to avoid build-up of explosive metallic azides in copper and lead plumbing. The total azide present in each pack is 75 mg.

Storage and shelf life

Store this product at a temperature of 2-8°C

Shelf-life: 67 days from availability.

Der 125I hTG Assay dient der direkten quantitativen in vitro Bestimmung von humanem Thyroglobulin (hTg) in humanem Serum. Das hTg Assay hat einen Messbereich von 0.25 - 250 ng/ml bei der Verwendung von 100 µl Serum Proben.

Einleitung

Thyroglobulin ist ein Jod-Glykoprotein, das aus heterogenen Molekülen besteht, deren Zusammensetzung zum Teil vom Grad der Jodierung abhängt. Die vorherrschende Molekülform ist 660 kDa (dimere Form, die beiden Untereinheiten sind durch nicht-kovalente Bindungen miteinander verbunden), aber in der Schilddrüse kommen sowohl größere als auch kleinere Molekülformen vor. Tg ist der Ort der Synthese und Speicherung der von der Schilddrüse produzierten Schilddrüsenhormone. Tg wird in den Schilddrüsenfollikeln synthetisiert und gespeichert, und ein Teil des nicht-enzymatisch verdauten Proteins wird bei Stimulation mit Thyreotropin (TSH) zusammen mit Thyroxin (T4) und Trijodthyronin (T3) in den Blutkreislauf freigesetzt.

Das zirkulierende Thyroglobulin kann bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen wie der Grave's multinodulären Struma, dem gutartigen Schilddrüsenadenom und Akutphase-Thyreoiditis erhöht sein. Die Bestimmung von Thyroglobulin durch Immunoassay-Methoden ist ein nützliches und anerkanntes Instrument zur Überwachung von Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkrebs-Patienten nach totaler Thyreoidektomie mit oder ohne Radiojod Ablation.

Aufgrund seiner Empfindlichkeit eignet sich der vorliegende hTg Assay für die Messung subnormaler hTg-Werte, die einen frühen und zuverlässigen Marker für ein Tumorrezidiv darstellen.

Testprinzip

Bei dieser Technologie werden zwei hoch affine monoklonale Antikörper in einem immunoradiometrischen Assay (IRMA) verwendet.

Der 125I-markierte Signal-Antikörper bindet an ein Epitop des Tg-Moleküls, das sich räumlich von dem unterscheidet, das der Biotin-Capture-Antikörper erkennt. Die beiden Antikörper reagieren gleichzeitig mit dem in den Standards oder Proben vorhandenen Antigen, was zur Bildung eines Komplexes aus Fängerantikörper, Antigen und Signalantikörper führt, der auch als "Sandwich" bezeichnet wird.

Während einer Inkubationszeit über Nacht wird der Immunkomplex an der reaktiven Oberfläche von mit Streptavidin beschichteten Teströhrchen immobilisiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch verworfen, die Teströhrchen werden gründlich gewaschen, und die Radioaktivität wird in einem Gamma-Zähler gemessen.

Die Antigenkonzentration ist direkt proportional zu der in den Röhrchen gemessenen Radioaktivität. Durch Erstellung einer Kalibrierungskurve, in der die Bindungswerte gegen eine Reihe von Kalibratoren aufgetragen werden, die bekannte hTg-Mengen enthalten, kann die unbekannte hTg-Konzentration in Patientenproben bestimmt werden.

Mitgelieferte Reagenzien

1. **TRACER I-125** 1 Flasche TRACER (21 ml), gebrauchsfertig, enthält ungefähr 980 kBq ¹²⁵I-anti-hTg und Fänger anti-hTg in Puffer mit rotem Farbstoff 0.1 % NaN₃.
2. **CAL 1 - 6** 6 Flaschen STANDARD (6 x 1.0 ml), enthalten (S1-S6) 0.3, 1.0, 4.0, 20, 100, 250 ng/ml hTg (kalibriert zu BCR CRM457) in Pferde-Schweine-Serum mit 0.1% NaN₃.
3. **CONTROL 1 / 2** 2 Flaschen KONTROLLSERUM (2 x 1.0 ml), in Pferde-Schweine-Serum mit 0.1% NaN₃. Die Konzentration der Kontrollseren ist im beiliegenden QC-Datenblatt angegeben.
4. **DIL** SERUM DILUENT (5.0 ml), enthält Pferde-Schweine-Serum und 0.1% NaN₃. Das Serumverdünnungsmittel dient auch als Nullkalibrator.
5. **RECOV** RECOVERY SERUM (1.0 ml), enthält human Serum und 0.1% NaN₃. Die Konzentration des Recovery Serums ist im beiliegenden QC-Datenblatt angegeben.
6. **SORB CT** 2 Boxen COATED TUBE, gebrauchsfertig. 2x50 beschichtete Teströhrchen, 12x75 mm, verpackt in Plastikboxen.
7. **WASH SOLN 35x** 1 Flasche Waschpufferkonzentrat (20 ml), enthält 0.2 % NaN₃. *Siehe Vorbereitung der Reagenzien*
8. QC-Datenblatt
9. Packungsbeilage

Zusätzlich benötigtes Material

Röhrchenständer, Präzisionspipetten mit Einwegspitzen (100, 200 und 2000 µl), Vortex-Mixer, Schüttler, Plastikfolie, saugfähige Tücher, Gamma-Zähler

Empfohlenes Material

Multipette (z.B.. Eppendorf oder ähnlich), Dispenser mit 1-L Reservoir (anstelle der 2-ml Pipette)

Probensammlung und Lagerung

Die Serumproben können gemäß den in der klinischen Laborpraxis routinemäßig angewandten Verfahren vorbereitet werden. Die Proben können bei 2-8 °C gelagert werden, wenn der Test innerhalb von 24 Stunden durchgeführt wird; andernfalls sollten Aliquots vorbereitet und tiefgefroren (-20°C) bis zu 3 Monate gelagert werden. Eingefrorene Proben sollten aufgetaut und vor der Testdurchführung gründlich gemischt werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden. Verwenden Sie keine lipämischen, hämolytierten oder trüben Proben. Proben mit einer hTg-Konzentration über 250 ng/ml sollten mit dem im Kit enthaltenen Serum Diluent verdünnt und erneut getestet werden.

Vorbereitung der Reagenzien und Lagerung

Das Waschpufferkonzentrat (20 ml) zu 700 ml destilliertem Wasser hinzufügen, um 720 ml Waschlösung zu erhalten. Nach der Verdünnung bei 2-8°C bis zum Verfallsdatum lagern.

Den Rest der Reagenzien nach dem Öffnen bei 2-8°C lagern. Bei dieser Temperatur ist jedes Reagenz bis zum Verfallsdatum stabil. Das tatsächliche Verfallsdatum ist auf dem Verpackungsetikett und im QC-Datenblatt angegeben.

Assaydurchführung

(Kurzanleitung siehe Tabelle 1.)

1. Reagenzien und Proben vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.
2. Beschriften Sie je zwei beschichtete Röhrchen für jeden Standard (S1-S6), das Kontrollserum (CI, CII), den Serum Diluent (D) als Nullkalibrator, die Wiederfindungsreferenz (DR), die Serumproben (Sx).
3. Homogenisieren Sie alle Reagenzien vor Gebrauch durch vorsichtiges Mischen. Vermeiden Sie Schaumbildung.
4. Pipettieren Sie 100 µl der Standards in die Standardröhrchen (S1-S6), 100 µl Kontrollen in die Kontrollröhrchen (CI, CII), 100 µl Probe in Probenröhrchen (Sx) und 100 µl Serum Diluent in die Serum Diluent Röhrchen (D) als Nullkalibrator. Verwenden Sie einen Röhrchen Ständer, um die Röhrchen zu halten. Berühren oder zerkratzen Sie den inneren Boden der Röhrchen nicht mit der Pipettenspitze.
5. 200 µl Tracer in alle Röhrchen pipettieren.
6. Alle Röhrchen gut mischen (vortexen) und mit einer Plastikfolie abdecken.
7. Alle Röhrchen für 15-24 Stunden bei RT (Raumtemperatur) inkubieren.
8. Geben Sie 2,0 ml verdünnten Waschpuffer in jedes Röhrchen. Dekantieren Sie den Überstand von allen Röhrchen, indem das Rack umgedreht wird. Das Gestell 2 Minuten lang umgedreht auf ein saugfähiges Papier stellen.
9. Bringen Sie den Röhrchenständer wieder in eine aufrechte Position und wiederholen Sie Schritt 9 zweimal.
10. Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter 60 Sekunden aus.
11. Berechnen Sie die Tg Konzentrationen der Proben wie unter „Berechnung der Ergebnisse“ beschrieben oder verwenden Sie eine spezielle Software.

Tabelle 1: Kurzanleitung, Pipettierschema (alle Volumina in µl)

**Wiederfindungstest ist optional*

Röhrchen Reagenz	Total (T)	Serum Diluent (D)	Standard (S ₁ -S ₆)	Probe (S _x)	Kontrolle (CI-CII)	Recovery tubes* (R _x)	Recovery reference tubes* (D _R)
Standard			100				
Probe				100		100	
Kontrolle					100		
Recovery serum						10	10
Serum diluent		100					100
Tracer	200	200	200	200	200	200	200
Inkubieren der Röhrchen für 15-24 Stunden bei RT							
Waschpuffer	2000	2000	2000	2000	2000	2000	2000
Überstand abkippen und auf Filterpapier abtropfen lassen							
Waschschritt zweimal wiederholen							
Messen der Radioaktivität (60 Sec/Röhrchen)							
Berechnung							

Interpretation der Ergebnisse

Bei der Interpretation der Testergebnisse sollte ein möglicher Einfluss störender Thyreoglobulin-Autoantikörper in der Probe ausgeschlossen werden.

Die Aussagekraft der gemessenen Serum-Thyreoglobulin-Werte sollte idealerweise durch die Bestimmung von Anti-TG in der Probe überprüft werden (zum Beispiel mit dem RK-8CT Anti-hTG [I-125] RIA-Kit). In bestimmten Fällen können zusätzlich sogenannte Recovery-Tests, wie nachfolgend beschrieben, hilfreich sein.

1. Beschriften Sie beschichtete Röhrchen in doppelter Ausführung für Wiederfindungsreferenz (DR) und Wiederfindungsserum (R_x).
2. Pipettieren Sie 10 µl Wiederfindungsserum in die Wiederfindungsreferenzröhrchen (DR) und in die Proben Wiederfindungsröhrchen (R_x).
3. Pipettieren Sie 100 µl Probe in die Wiederfindungsröhrchen (R_x) und 100 µl Serum Diluent in die Wiederfindungs-Referenzröhrchen (DR).
4. Wie bei Testverfahren 5-11.

Die Wiederfindung (in %) der Serum-Probe kann anhand folgender Formel ermittelt werden:

$$\frac{\text{ng Tg/ml R}_x - \text{ng Tg/ml S}_x}{\text{ng Tg/ml DR}} \times 100 = \% \text{ Wiederfindung}$$

Wiederfindungen zwischen 70% und 130% werden als gültig angesehen. Werte von <70% oder >130% sind auf Interferenzen zurückzuführen und der Tg-Wert der entsprechenden Originalprobe wird als ungültig betrachtet.

Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung wird anhand repräsentativer Daten veranschaulicht. Die gesammelten Testdaten sollten den in Tabelle 2 angegebenen Daten ähneln.

Berechnen Sie die durchschnittliche count per minute (CPM) für jedes Paar von Teströhrchen.

Berechnen Sie die normalisierte prozentuale Bindung für jeden Standard, jede Kontrolle und jede Probe mit Hilfe der folgenden Gleichung:

$$B/T(\%) = \frac{1 - C / Sx / Rx \text{ (cpm)} - D}{T(\text{cpm})} \times 100$$

Unter Verwendung von halblogarithmischem Millimeterpapier B/T (%) tragen Sie jeden Standard gegen die entsprechende hTg-Konzentration auf.

Bestimmen Sie die hTg-Konzentration der unbekannten Proben durch Interpolation aus der Standardkurve. Extrapolieren Sie keine Werte, die über den Bereich der Standardkurve hinausgehen.

Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „logit-log“ oder „spline fitting“-Kurvenfunktion.

Tabelle 2: Typische Assaydaten:

Tubes	hTg ng/mL	Mean cpm (n = 20)	B/T%	hTg ng/mL
T		293137		
D (NSB)	0	110	0.04	
S0.3	0.3	398	0.13	
S1,0	1.0	916	0.31	
S4,0	4.0	2648	0.89	
S20	20	10154	3.43	
S100	100	48363	16.33	
S250	250	107279	36.23	
CI		1457	0.49	1.9
CII		36295	12.26	77.9

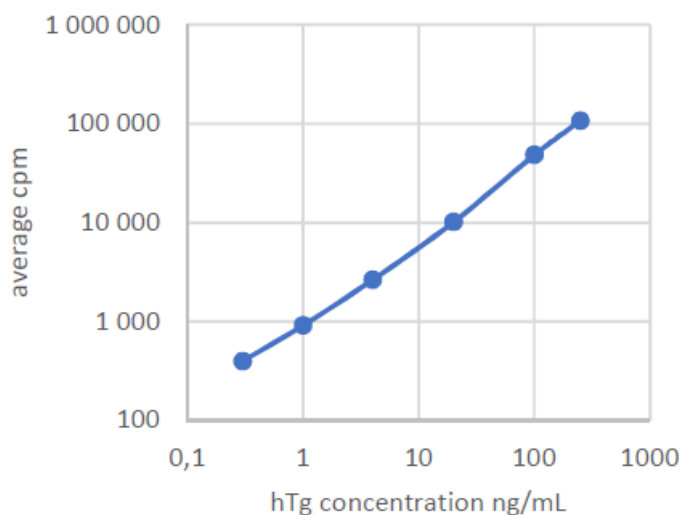


Abbildung 1: Eine typische Standardkurve

(Nicht für die Berechnung unbekannter Proben verwenden)

Assay Charakteristika**Empfindlichkeit**

Limit of Blank (LoB), Limit of Detection (LoD) und Limit of Quantitation (LoQ) wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien im CLSI Dokument EP17-A2 bestimmt.

Limit of Blank (LoB): 0.025 ng/mL

Limit of Detection (LoD): 0.10 ng/mL

Limit of Quantitation (LoQ): 0.20 ng/mL

Hook-Effekt

Bis zu einer hTg-Konzentration von 20000 ng/ml gibt es keinen hochdosierten Hook-Effekt.

Linearität

Die Linearität wurde unter Verwendung der Polynom-Methode gemäß der CLSI EP06-A-Richtlinie bewertet. Die Methode wurde von 0.1 ng/ml bis 274 ng/ml linear gefunden mit einer Abweichung von 10 % in diesem Intervall.

Wiederfindung – Additionstest

Der Wiederherstellungstest wurde wie zuvor in dieser Gebrauchsanweisung beschrieben durchgeführt. 92 einzelne Humanserumproben, die zuvor negative auf anti-hTG getestet wurde, wurden mit Recovery serum aus dem Kit gespiked. Die hTg-Basiskonzentration der Proben (Sx) und die hTg Konzentration der gespikten Proben (Rx) wurden gemessen. Der erwartete Anstieg (DR) ist der, welcher mit gespiktem Serum Diluent (mit einer hTG Konzentration von Null) mit Recovery Serum gemessen wird. Die Wiederfindung in % wird berechnet als Prozentsatz der gemessenen Zunahme pro erwarteter Zunahme von hTg in jeder gespikten Probe:

$$\text{Recovery \%} = \frac{Rx - Sx}{DR} \times 100$$

Die Durchschnittliche Wiederfindung betrug 109.9%. Das höchste Ergebnis ist 119% und das niedrigste 93.1%.

Genauigkeit**Single-site precision**

Die Single-Site Präzision wurde anhand von 5 Serumpools mit unterschiedlichen hTg-Konzentrationen gemäß dem CLSI-Dokument EP05-A3 berechnet. Die Proben wurden an zwanzig Testtagen in zwei Durchläufen pro Tag und mit zwei Replikate pro Durchgang gemessen.

Sample	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-laboratory Precision	
		SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	0.27	0.03	10.83	0.04	15.54
Pool 2	5.43	0.23	4.19	0.25	4.67
Pool 3	20.18	0.47	2.31	0.65	3.22
Pool 4	52.89	0.92	1.73	1.39	2.62
Pool 5	136.55	4.41	3.23	4.63	3.39

Multisite precision

Die Multisite-Präzision wurde anhand von 5 Serumpools mit unterschiedlichen hTg Konzentrationen gemäß dem CLSI-Dokument EP05-A3 berechnet. Die Proben wurden an drei verschiedenen Standorten gemessen, an jedem Standort wurden fünf Läufe durchgeführt, ein Lauf pro Tag und fünf Wiederholungen pro Lauf.

Sample	Mean (ng/mL)	Repeatability		Within-laboratory Precision		Reproducibility	
		SD	CV%	SD	CV%	SD	CV%
Pool 1	0.258	0.032	12.46	0.036	13.92	0.039	14.95
Pool 2	5.075	0.334	6.59	0.344	6.78	0.366	7.21
Pool 3	18.86	0.977	5.18	1.003	5.32	1.017	5.39
Pool 4	49.58	1.892	3.82	2.108	4.25	2.128	4.29
Pool 5	129.84	6.554	5.05	6.886	5.30	6.941	5.35

Referenzintervall

Das Referenzintervall wurde gemäß der EP28-A3c CLSI Leitlinie unter Verwendung der nicht-parametrischen Methode ermittelt. 484 mutmaßlich gesunde Blutspender wurden ausgewertet.

Die ermittelten zentralen 95%-Referenzgrenzen (mit 90%igem Konfidenzintervall) liegen zwischen **0,3 ng/mL** (0,22 - 0,51 ng/mL) und **50 ng/mL** (40,6 - 69,7 ng/mL).

Es wird empfohlen, dass jedes Labor einen Referenzbereich für gesunde Personen für die eigene Patientenpopulation festlegt, da dieser in verschiedenen Laboratorien oder Regionen variieren kann.

Interferenz

Der Interferenztest wurde gemäß CLSI-Dokument EP7-A2. Vordefinierte akzeptable Interferenzschwelle: <15%. Interferenzen konnten bei endogenen Substanzen und Drogen bis zu folgender Konzentration nicht nachgewiesen werden:

Bilirubin	684 µmol/L
Triglycerides	16.94 mmol/L
Haemoglobin	10 g/L
Rheumatoid Factor	400 IU/mL
Biotin	100 ng/mL
Acetaminophen	15.6 mg/dL
Acetylsalicylic acid	3.0 mg/dL
Ascorbic acid	5.25 mg/dL
Diclofenac	2.4 mg/dL
Ibuprofen	21.9 mg/dL
Levothyroxine	10 µg/mL
hTSH	1.5 µg/mL
Sorafenib	500 µg/mL
Lenvatinib	15 µg/mL

Hinweise zur Durchführung

1) **Fehlerquelle!** Die in Plastikboxen verpackten reaktiven Reagenzgläser sind nicht einzeln gekennzeichnet. Es sollte darauf geachtet werden, dass sie nicht mit gewöhnlichen Röhrchen vermischt werden. Um dieses Risiko zu minimieren, sollten Sie nie mehr Röhrchen als nötig aus der Plastikbox nehmen und die nach der Arbeit übrig gebliebenen zurück in die Box stellen. Es wird empfohlen, die Teströhrchen mit einem Markierstift zu beschriften.

2) **Zufügen der Waschlösung.** Verwenden Sie für das Hinzufügen der Waschlösung einen Laborüblichen Dispenser mit einer 1-L Glasflasche und einem flexiblen Ablassschlauch. Falls Ihnen dieses Gerät nicht zur Verfügung steht können Sie eine großvolumige Spritze angeschlossen an eine „Repeating Pipette“ verwenden.

Zusätzliche Informationen

Komponenten verschiedener Lots oder Kits verschiedener Hersteller sollten nicht gemischt oder ausgetauscht werden.

Warnhinweise

Radioaktivität

Dieses Produkt enthält radioaktives Material. Es liegt in der Verantwortung des Nutzers, die lokalen Bestimmungen oder gesetzliche Vorschriften die den Umgang mit radioaktivem Material betreffen, einzuhalten.

Potenziell infektiöses Material

Die in diesem Kit verwendeten humanen Blutprodukte stammen von gesunden Spendern. Sie wurden individuell mit anerkannten Methoden (EIA, Enzym Immunassay) negativ auf Humane Immunodeficiency Virus Antikörper (Anti-HIV-1/2), Hepatitis-C Antikörper (anti-HCV), Treponema Antikörper und Hepatitis-B Oberflächen Antigen (HBsAg) getestet. Beim Umgang mit humanen Proben, die in diagnostischen Kits getestet werden, sollte immer große Sorgfalt gelten. Auch wenn eine Person negativ getestet wurde, kann keine Methode komplette Sicherheit gewähren, dass keine anderen infektiösen Erreger vorhanden sind. Daher sollten humane Blutproben grundsätzlich wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.

Alle tierischen Produkte und Derivate wurden von gesunden Tieren gewonnen. Dennoch sollten Bestandteile, die tierische Substanzen enthalten, als potenziell infektiöses Material behandelt werden.

Chemische Gefährdung

Die Komponenten enthalten Natrium Azid als antimikrobielles Mittel. Bei der Entsorgung des Abfalls sollte mit ausreichend Wasser nachgespült werden, um die Anhäufung von explosivem metallischem Azid in Kupfer- und Bleirohren zu vermeiden. Die Gesamtmenge von Azid in jedem Paket beträgt 75 mg.

Lagerung und Haltbarkeit

Lagern Sie dieses Produkt bei einer Temperatur von 2-8°C.
Haltbarkeit: 67 Tage ab Verfügbarkeit

Literature/Literatur

1. Feldt-Rasmussen U et al. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(10-11):337-42. Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 1st Part: Assessment of homogeneity, stability and immunoreactivity.
2. Feldt-Rasmussen U et al. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1996;54(10-11):343-8. Human thyroglobulin reference material (CRM 457). 2nd Part: Physicochemical characterization and certification.
3. Haugen BR, Alexander EK, Bible KC, Doherty GM, Mandel SJ, Nikiforov YE, Pacini F, Randolph GW, Sawka AM, Schlumberger M, Schuff KG, Sherman SI, Sosa JA, Steward DL, Tuttle RM, Wartofsky L. 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2016 Jan;26(1):1-133.
4. F. Pacini, M. G. Castagna, L. Brilli & G. Pentheroudakis. Thyroid cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* 23 (Supplement 7): vii110–vii119, 2012.
5. Yoo JY, Stang MT. Current Guidelines for Postoperative Treatment and Follow-Up of Well-Differentiated Thyroid Cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2016, Jan;25(1):41-59.
6. Giovanella L, Castellana M, Trimboli P. Unstimulated high-sensitive thyroglobulin is a powerful prognostic predictor in patients with thyroid cancer. *Clin Chem Lab Med*. 2019 Dec 18;58(1):130-137.
7. Kelly A, Barres B, Kwiatkowski F, Batisse-Lignier M, Aubert B, Valla C, Somda F, Cachin F, Tauveron I, Maqdasy S. Age, thyroglobulin levels and ATA risk stratification predict 10-year survival rate of differentiated thyroid cancer patients. *PLoS One*. 2019 Aug 19;14(8):e0221298.
8. Farnaz Nesari Javan, Narjes Ayati, Kayvan Sadri, Esmat Ramezanzadeh, Fateme Farahmandfar, Somaye Beheshti, Seyed Rasoul Zakavi. Evaluation thyroglobulin level during suppressive therapy measured by ultrasensitive technique in the prediction of excellent response in patients with differentiated thyroid cancer. *Iran J Nucl Med* 2022;30(2):109-114.
9. van Kinschot CMJ, Peeters RP, van den Berg SAA, Verburg FA, van Noord C, van Ginhoven TM, Visser WE. Thyroglobulin and thyroglobulin antibodies: assay-dependent management consequences in patients with differentiated thyroid carcinoma. *Clin Chem Lab Med*. 2022 Jan 28;60(5):756-765.
10. 1CLSI. Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP05-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
11. NCCLS. Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. NCCLS document EP6-A. Wayne, PA; 2003.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2005.
13. CLSI. Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
14. CLSI. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
15. Giovanella L, D'Aurizio F, Algeciras-Schimnich A, Görges R, Petranovic Ovcariček P, Tuttle RM, Visser WE, Verburg FA; hsTg&TgAb Consensus Working Group. Thyroglobulin and thyroglobulin antibody: an updated clinical and laboratory expert consensus. *Eur J Endocrinol*. 2023 Aug 2;189(2):R11-R27.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Française	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	utilisation Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertrieb durch	Distribution par	Distribución por	Distribuzione da parte di
	Version	Version	Version	Versión	Versione
	Single-use	Einmalverwendung	À usage unique	Uso único	Uso una volta