



EIASON[®] TgCa



Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Thyreoglobulin
im Humanserum

Anleitung

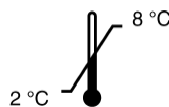
Nur für in-vitro Gebrauch

Produkt von







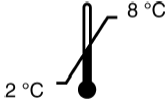













IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu

REF E01-012-96



Verwendete IFU-Symbole

Symbol	Deutsch	Symbol	Deutsch
	In vitro Diagnostikum		Konjugat
	Bestellnummer		Konjugatpuffer
	Hergestellt von		Verdünnungspuffer
	Lagerung bei		Standards
	Europäische Konformität		Kontrollseren
	Verwendbar bis		Substrat
	Chargenbezeichnung		Stopplösung
	Microtiterplatte		Waschlösung
	Startpuffer		Recovery Kontrolle

Verwendete Abkürzungen



Wiederfindekontrolle



Wiederfindepatientenprobe

Verwendungszweck

Nur für in-vitro Gebrauch.

Serum-Thyreoglobulin (Tg) Messungen sind von substantiellem Wert bei der Verlaufskontrolle des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms nach totaler Schilddrüsenablation. Da Tg nur durch Schilddrüsenfollikelzellen produziert wird, sollte es nach der Schilddrüsentotalentfernung unbestimmbar sein. Diese messbaren und steigenden Tg Werte sind frühe Indikatoren von permanenten oder rezidiven Erkrankungen. Der EIASON[®] TgCa Kit bietet eine beispiellose Sensitivität für die quantitative Bestimmung von Tg im Humanserum. Die Ergebnisse sollten in Verbindung mit anderen klinischen oder labordiagnostischen Daten verwendet werden, um den Arzt bei der Beurteilung einer Schilddrüsendysfunktion zu unterstützen.

Messprinzip

Der EIASON[®] TgCa Kit ist ein Sandwich Assay, in welchem Tg in den Testseren durch eine hohe Affinität von mit Tg Antikörpern beschichteten Wells gebunden wird. Gebundenes Tg wird dann durch Hinzufügen von einem zweiten mit Meerrettich Peroxidase konjugierten Tg-Antikörper bestimmt.

Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen

Der EIASON[®] TgCa Kit ist nur zur in-vitro Diagnostik und nicht zur Anwendung bei Mensch und Tier geeignet. Dieses Produkt darf nur exakt wie in der mitgelieferten Anleitung beschrieben, eingesetzt werden. IASON kann nicht für einen eventuellen Verlust oder Schaden, (sofern nicht gesetzlich etwas anderes festgelegt ist), haftbar gemacht werden, der durch Nichtbeachtung der Instruktionen entsteht.

VORSICHT: Dieser Kit enthält Material menschlichen und/oder tierischen Ursprungs. Die Kitreagenzien sind so zu handhaben, als ob eine Übertragung einer Infektionskrankheit möglich sei. Rohmaterial humanen Ursprungs, das in diesem Kit zum Einsatz kommt ist negativ auf HBsAg, HCV und HIV-Antikörper geprüft. Da es kein diagnostisches Verfahren gibt, welches derartige Erreger mit 100%iger Sicherheit ausschließt, sind die entsprechenden Komponenten wie potentiell infektiöse Proben handzuhaben.

Angemessene Vorsichtsmaßnahmen und die Regeln der guten Laborpraxis sollten beim Gebrauch und der Entsorgung angewendet werden. Die Entsorgung der Kitreagenzien hat nach den örtlichen Vorschriften zu erfolgen.

Haltbarkeit und Lagerung der Reagenzien

Dieser Kit ist bei vorschriftsmäßiger Lagerung bis zum Ablauf des Verfallsdatum stabil. Nach Erhalt sind alle Reagenzien bei 2-8°C zu lagern.

Lagerung und Vorbereitung der Patientenproben

Die Proben sollen nach der Abnahme durch Zentrifugieren getrennt werden. Sie können bis zu 3 Tage bei 2-8°C aufbewahrt werden. Eine längere Lagerung wird bei -20°C empfohlen. Keine lipämischen und stark hämolytischen Patientenproben verwenden. Kein Plasma verwenden.

Wenn erforderlich, die Patientenproben bei Raumtemperatur auftauen lassen und gut vortexen. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

*Anti Tg positive Patientenproben induzieren eine gestörte Wiederfindung. Daher müssen die Proben auf **Tg-AK negativ** getestet werden.*

Kitbestandteile

Alle Reagenzien A – K vor Gebrauch auf Raumtemperatur bringen.

- A. **MPL**: mit monoklonalen Tg Antikörpern beschichtet (96 Wells, 8 Wells pro Streifen). Vor dem Öffnen der Mikrotiterstreifenpackung sollten diese für mind. 30 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) lagern. Nicht benötigte Wells in die originale Folienverpackung zurückgeben, zukleben, in das Säckchen mit dem Trockenmittel geben und gut verschließen. Bei 2-8° C aufbewahren und innerhalb von 3 Monaten verbrauchen. Wir empfehlen die Wells am selben Tag nach dem Öffnen der Packung zu verwenden.
- B. **START**: 4 ml; gebrauchsfertig
Beinhaltet Maus-IgG zur Blockierung von HAMA (Humane Anti-Maus Antikörper), welche in der Patientenprobe vorhanden sein könnten.
- C. **CAL1** – **CAL9**: lyophilisiert
Abhängig von der Verdünnung der Patientenproben
0; 0,03; 0,05; 0,1; 0,3; 1; 2; 3 und 10 ng/ml
Kalibriert gegen den humanen Tg Standard CRM 457 (Community Bureau of Reference, Brussels).
Jedes Fläschchen mit 1,0 ml Aqua dest. rekonstituieren; bei 2-8°C bis max. 4 Wochen aufbewahren.
- D. **CO1**, **CO2**: lyophilisiert
Jedes Fläschchen mit 1,0 ml Aqua dest. rekonstituieren und danach 1:100 mit **DIL** verdünnen. Aufbewahren bei 2-8°C bis max 4 Wochen. Konzentrationen siehe Qualitätskontroll-Zertifikat.
- E. **RC**: Recovery Kontrolle, 5 ngTg/ml; lyophilisiert
Mit 1,5 ml Aqua dest. rekonstituieren; aufbewahren bei 2-8°C bis max. 4 Wochen.
- F. **WASH**: 125 ml
Mit Aqua dest. 1+9 verdünnen.
- G. **CONJBU**: 25 ml; gebrauchsfertig
- H. **CONJ**: lyophilisiert
Mit 20 ml **CONJBU** rekonstituieren; aufbewahren bei 2-8°C bis max. 4 Wochen.

- I. **DIL**: 100 ml; gebrauchsfertig
Zur Verdünnung von Patientenproben und Kontrollen.
- J. **SUB**: 12 ml; TMB; gebrauchsfertig
- K. **STOP**: 12 ml; 0,5M H₂SO₄; gebrauchsfertig

Erforderliches Zubehör

- Pipetten
- Aqua dest.
- Mikrotiterplatten-Photometer: Wellenlängen bei 450 nm, 405 nm, 620 nm

Manuelle Vorbereitung

Vorbereitung der **CO1**, **CO2**, **WFK** und **WFPP**

- **CO1**, **CO2** 1:100 mit **DIL** verdünnen; z.B.: 10 µl + 990 µl
- **30 µl** rekonstituierte **WF** mit **300 µl DIL** mischen, um die **WFK** zu erhalten.
- **30 µl WF** mit **300 µl** von jeder Patientenprobe mischen, um die **WFPP** zu erhalten. Jedes **WFPP** bei dem entsprechenden Patientenserum pipettieren.

Testdurchführung

1. Die Anzahl der erforderlichen Streifen für die **MPL** berechnen:
 - **CAL1** – **CAL9**
 - **CO1**, **CO2**
 - **WFK**
 - Anzahl der Patientenproben + **WFPP**

Es wird empfohlen, dass alle Proben doppelt bestimmt werden. In diesem Fall sind 4 Wells pro Patientenprobe, sowie je 2 Wells für die **CAL1** – **CAL9**, **CO1**, **CO2** und die **WFK** erforderlich.

Alle Reagenzien inklusive der erforderlichen Anzahl der Streifen auf Raumtemperatur bringen. Die Streifen fest in den dafür vorgesehenen Rahmen drücken.

2. **CO1**, **CO2**, sowie die **WFK** und die **WFPP** vorbereiten (siehe oben).
3. 25 µl **START** pipettieren.
4. 25 µl **CAL1** – **CAL9**, **CO1**, **CO2**, **WFK**, Patientenproben und **WFPP** pipettieren.
5. Die Platte zukleben und 2 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C) schütteln.
6. Nach der 2 Stunden-Inkubation, die **MPL** 3 x waschen. Die Flüssigkeit absaugen oder dekantieren. 350 µl **WASH** pipettieren. Den Vorgang 2 x wiederholen. Die **WASH** absaugen oder dekantieren. Die **MPL** auf Zellstoff gut ausklopfen.

7. 200 µl rekonstituiertes **KONJ** vorsichtig pipettieren.
8. Die Platte zukleben und für 17 – 21 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C) inkubieren.
9. 3 x wie in Punkt 7 beschrieben mit **WASH** waschen.
10. 100 µl **SUB** vorsichtig pipettieren.
11. 15 Minuten bei Raumtemperatur (20-25°C) im Dunklen inkubieren. Während der Inkubation kommt es zu einer Farbentwicklung.
12. Die Farbentwicklung wird durch vorsichtige Zugabe von 100 µl **STOP** unterbrochen (die Zugabe der **STOP** bewirkt einen Farbumschlag von blau auf gelb). Die Platte anschließend ca. 5 Sekunden schütteln. *Es ist sehr wichtig sicherzustellen, dass die Substratinkubationszeit (d.h. die Zeit von der Zugabe des **SUB** bis zur Zugabe der **STOP**) für jedes Well gleich lang ist.*
13. Die Absorption der Wells wird bei 450nm mittels Photometers (Referenzfilter 620 – 650 nm, Overrange 405nm) innerhalb von 10 Minuten nach dem Hinzufügen der **STOP** gemessen.

oder vollautomatisiert auf:

- **IASON[®] miniLisa**
- **IASON[®] PersonalLab**
- **IASON[®] Gladiator**

Qualitätskontrolle

Es ist ratsam, regelmäßig Kontrollproben unterschiedlicher Analytkonzentrationen einzusetzen, um sicherzustellen, dass man von Tag zu Tag reproduzierte Ergebnisse erzielt. Zwei positive Kitkontrollen und eine WFK werden zur Verfügung gestellt. Die Kontrollen sollten wie unbekannte Proben getestet werden. Um die Leistung des Assays zu überwachen, sollten Qualitätskontrolltabellen geführt werden.

Ergebnisberechnung

- Erstellung einer Kalibrationskurve: Tragen Sie die Absorptionen auf der y-Achse auf und die Tg-Konzentrationen auf der x-Achse. So können die Tg-Konzentrationen der Patientenproben und Kitkontrollen abgelesen werden.
- Alternative Auswertemethoden können verwendet werden, allerdings sollte bestätigt werden, dass der gewählte Kurvenverlauf geeignet ist und akzeptable Ergebnisse liefert. 4 Parameter Logistik oder Point-to-Point – Auswertung werden empfohlen.

Berechnung der Wiederfindung

Die Wiederfindung in % wird wie folgt berechnet:

Die gemessene Konzentration der Wiederfindung des Patienten minus der Konzentration der eigentlichen Patientenprobe geteilt durch die Konzentration der Wiederfindekontrolle x 100.

$$100 \times \frac{WFPP \text{ (ng/ml)} - \text{Probe (ng/ml)}}{WFK \text{ (ng/ml)}} = \% \text{ Wiederfindung}$$

Im Allgemeinen gilt Wiederfindungen zwischen 70 und 130% als korrekt.

Beeinträchtigungen durch Tg-Antikörper

Bei ca. 15% der Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom sind Tg-Autoantikörper nachweisbar. Diese können die Tg Messungen stören. Obwohl diese Beeinträchtigung mit dem EIASON[®] TgCa reduziert wird, wird die Messung von Tg-Antikörper in den Patientenseren dringend empfohlen.

Bei nicht feststellbaren Tg-Konzentrationen sollte das Vorhandensein von Tg-Antikörpern in Betracht gezogen werden, sogar im Fall einer nicht gestörten Wiederfindung.

Normalbereich

- **Gesunde Personen:**
ca. 2,5 – 120 ng/ml
- **Differenzierte Schilddrüsenkarzinome in vollständiger Remission nach der Schilddrüsentotalentfernung:**
unter 0,5 – 1 ng/ml bei TSH-unterdrückender Schilddrüsenhormon-Behandlung; kein Tg- Anstieg unter TSH-Stimulation.

Tg-Werte über dieser "Grauzone" (insbesondere im Fall von TSH-unterdrückender Behandlung) zeigen dringend die Notwendigkeit von umfassenden diagnostischen Untersuchungen an.

Wir empfehlen jedem Labor, seinen eigenen Normalbereich für die lokale Bevölkerung festzulegen.

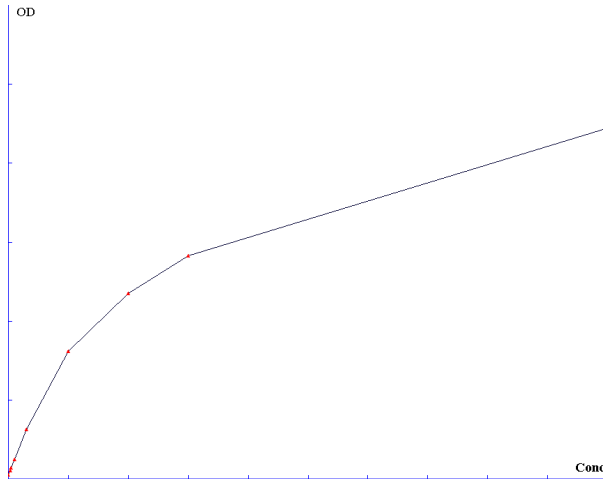
Assay Beispieldaten

Typische Ergebnisse der EIASON[®] TgCa Standards:

CAL1 – CAL9 ng/ml	Absorption bei 450 nm
0	0,080
0,03	0,146
0,05	0,200
0,1	0,322
0,3	0,730
1	1,800
2	2,623
3	3,118
10	3,940

Diese Daten dienen nur zur Illustration und dürfen nicht für die Berechnung der Probenergebnisse verwendet werden.

Typische Eichkurve



Diese Eichkurve dient nur als Beispiel zur Illustration.

Assay Präzision und Sensitivität

Analytische Assaysensitivität: 0,002 ng/ml Tg

Berechnet aus dem Mittelwert von 20 Bestimmungen des Nullstandards plus 2facher Standardabweichung. Diese definierte Sensitivitätsgrenze ist gleichwertig mit dem geringsten maßgeblichen Messbereich.

Funktionelle Assaysensitivität: 0,02 ng/ml Tg

Berechnet aus der niedrigsten Konzentration, für die die InterAssay Variation weniger als 20% oder die InterAssay Variation weniger als 10% beträgt.

Assayspezifität

Die Verfälschung einer Tg – Bestimmung durch spezifisch und nicht spezifisch agierende Serumfaktoren kann nicht ausgeschlossen werden. Daher muss jeder Tg-Wert durch die Wiederfindung in % geprüft werden.

High dose hook Effekt

Serumproben wurden bis zu Tg-Konzentrationen von 4000 ng/ml gemessen und dabei wurde dieser Effekt nicht beobachtet.

Literatur

1. Schlumberger M and Baudin E. Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology* (1998) 138:249-252.
2. Zöphel K, Wunderlich G, Liepach U, Koch R, Bredow J, and Franke -G. Recovery-test or immunoradiometric measurement of anti-thyroglobulinautoantibodies. *Nuklearmedizin* (2001) 40:155-163.
3. Pfannenstiel P. Is the determination of Thyroglobulin (Tg) indicated in non malignant thyroid disorders?. *Der Nuklearmediziner* (1991) 3,14:153-157.
4. Mazzaferri R. et al. A Consensus Report of the Role of Serum Thyroglobulin as a Monitoring Method for Low-Risk Patients with Papillary Thyroid Carcinoma. *J.Clin. Endocrinology. & Metabolism* (2003) 88(4):1433-1441.

Arbeitsschema

1. Vorbereitung manuell

A	CO1, CO2	DIL	990 µl
		CO1, CO2	10 µl
B.	WFK	DIL	300 µl
		RC	30 µl
C.	WFPP	Patientenprobe	300 µl
		RC	30 µl

2. Testdurchführung, optional automatisiert

1.Pipettieren	START	25µl
2.Pipettieren	CAL1 – CAL9 25 µl	CO1, CO2, WFK 25 µl
		Patientenprobe WFPP, ... 25 µl
3.Inkubieren	2 Stunden bei Raumtemperatur schütteln (20-25°C)	
4.Waschen	Flüssigkeit absaugen oder dekantieren, 350 µl WASH pipettieren, absaugen oder dekantieren, Vorgang noch 2 x wiederholen, auf Zellstoff abtropfen	
5.Pipettieren	CONJ	200 µl
6.Inkubieren	17-21 Stunden bei Raumtemperatur (20-25°C)	
7.Waschen	siehe Punkt 4	
8.Pipettieren	SUB	100 µl
9.Inkubieren	15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen	
10.Pipettieren	STOP	100 µl
11.Messen	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Faktor: 3 (photometerabhängig), innerhalb von 10 Min. messen Auswertung: 4-Parameter or Point-to-Point	

Erwartete Werte

ngTg/ml	
Analytische Assaysensitivität	0,002



EIASON[®] TgCa



Enzymeimmunoassay for quantitative determination of
Thyroglobulin in human serum

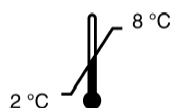
Kit instruction

For in-vitro use only







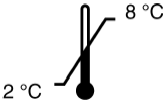











Product of



IASON GmbH
Feldkirchner Straße 4
A – 8054 Graz-Seiersberg
Tel.: +43 (0)316 28 43 00
Fax: +43 (0)316 28 43 00-4
Email: office@iason.eu
www.iason.eu



Used IFU-Symbols

Symbol	English	Symbol	English
	In vitro Diagnostic device		Conjugate
	Order number		Conjugate Buffer
	Product of		Dilution Buffer
	Storage by		Calibrators
	Microplate		Control sera
	EC Declaration of Conformity		Substrate
	Expiry date		Stop solution
	Lot number		Wash solution
	Start Buffer		Recovery control

Abbreviations used in the IFU:



Recovery control



Recovery patient sample

Intended Use

For in-vitro use only.

Serum thyroglobulin (Tg) measurements are of substantial value in the management of differentiated thyroid carcinoma after initial treatment. Since Tg is solely produced by thyroid follicular cells it should be undetectable after total thyroid ablation. Thus measureable and increasing serum Tg levels are an early indicator of persistent or recurrent disease.

The EIASON[®] TgCa kit offers unprecedented sensitivity for the quantitative determination of Tg in human serum samples. Results are to be used in conjunction with other clinical and laboratory data to assist the clinician in the assessment of thyroid dysfunction or thyroid carcinoma.

Assay principle

The EIASON[®] TgCa kit is a sandwich assay in which Tg in test sera is captured by a high affinity Tg antibody coated onto ELISA plate wells. Captured Tg is then detected by addition of a second Tg antibody conjugated to horseradish peroxidase.

Warnings and Precautions

The EIASON[®] TgCa kit is for in vitro diagnostic use only and is not for internal use in humans or animals. This product must be used strictly in accordance with the instructions set out in the Package Insert. IASON will not be held responsible for any loss or damage (except as required by statute) caused, arising out of non-compliance with the instructions provided.

CAUTION: this kit contains material of human and/or animal origin. Handle kit reagents as if capable of transmitting an infectious agent.

Source material from Human origin which is used in this kit was tested and found negative for HbsAG and HIV as well as for HCV antibodies. However, since there is no diagnostic procedure that excludes these agents with 100 percent certainty all components should be handled as potentially hazardous material.

Appropriate precautions and good laboratory practices must be used in the storage, handling and disposal of the kit reagents. Disposal of kit reagents should be in accordance with local regulations.

Shelf Life and Storage of Reagents

This kit is stable until the stated expiry date if stored as specified. Upon receipt, store all reagents at 2-8°C.

Storage and preparation of serum samples

Sera have to be isolated by centrifugation. They can be stored up to 3 days at 2-8°C. A longer storage is recommended at -20°C.

Do not use lipaemic or grossly haemolysed serum samples.

Do not use plasma in the assay.

When required, thaw test sera at room temperature and mix gently to ensure homogeneity.

*The patients sera have to be tested **Tg-Ab negative**, otherwise interference might produce false results*

Materials provided

Allow all reagents A-K to reach room temperature before use.

- A. **MPL** coated with monoclonal Tg antibody (96 wells in total, 8 wells per strip). Before opening the packet of strip wells, allow it to stand at room temperature (20-25°C) for at least 30 minutes. After opening, keep any unused wells in the original foil packet (reseal with adhesive tape) and in the self-seal plastic bag with the desiccant provided. Store at 2-8°C and use within 4 weeks. However, we recommend that strip wells are used on the same day the foil packet is opened. A frame for holding the wells during assays is also provided.
- B. **START**: 4 ml; ready to use.
Contains mouse IgG to block any HAMA (human anti-mouse antibodies) which might be present in patient sera.
- C. **CAL1** - **CAL9**: freeze dried
0; 0.03; 0.05; 0.1; 0.3; 1; 2; 3; and 10 ng/ml
Calibrated against the human Tg standard CRM 457 (Community Bureau of Reference, Brussels).
Reconstitute each vial with 1.0 ml aqua dest.; store at 2-8°C for up to 4 weeks.
- D. **CO1**, **CO2**: freeze dried
Reconstitute each vial with 1.0 ml aqua dest. and subsequently dilute 1:100 with sample diluent; store at 2-8°C for up to 4 weeks.
Concentrations according to the chosen patient sample dilution (see QC-Certificate)
- E. **RC**: 5 ng/ml; freeze dried
Reconstitute with 1.5 ml aqua dest; store at 2-8°C for up to 4 weeks
- F. **WASH**: 125 ml
Dilute 1+9 with aqua dest.; store at 2-8°C for up to 4 weeks.
- G. **CONJBU**: 25 ml; ready to use
- H. **CONJ** (Tg antibody peroxidase labelled): freeze dried
Reconstitute with 24 ml conjugate puffer; store at 2-8°C for up to 4 weeks
- I. **DIL**: 100 ml; ready to use
For dilution of patient sera and controls.
- J. **SUB** (TMB): 12 ml; ready to use
- K. **STOP** (0.5 M H₂SO₄): 12 ml; ready to use

Materials required but not provided in the kit

- Pipettes
- Distilled water
- ELISA plate reader suitable for 96 well formats and capable of measuring absorbances at 450, 620, 405 nm

Assay procedure

1. Calculate the number of individual ELISA plate wells needed for all components of the assay:
 - calibrators
 - controls
 - recovery control
 - patient samples
 - patient samples + recovery samples

It is recommended to run all components in duplicate. In such a case 4 wells per patient sample, as well as 2 wells for all other components are needed.

Allow all the reagents supplied including the appropriate number of strips to reach room temperature, fit the number of strip wells required firmly into the frame provided.

2. See *Recovery test procedure* below to prepare the recovery sera (RCC and RCPS) and treat them from here on like regular patient samples.
3. Pipette 25 µl of START into each well which is going to be used in the assay.
4. Pipette 25 µl of CAL1 – CAL9, CO1, CO2, RCC (Recovery Control), patient sample (undiluted or diluted) and RCPS (RC + patient sample (undiluted or diluted)) into the wells (in duplicate).
5. Cover the frame and shake the wells containing the various samples for 2 hours at 20-25° on an ELISA plate shaker.
6. After the 2-hour incubation (point 3), discard the samples by briskly inverting the frame of strip wells over a suitable receptacle. Wash 3 times with 350 µl WASH per well and each time tap the inverted wells gently on a clean dry absorbent surface to remove any droplets of wash buffer.
7. Pipette carefully 200 µl of reconstituted CONJ into each well.
8. Cover the frame and incubate for 17 – 21 hours at 20-25°C without shaking.
9. Wash 3 times as described in point 7.
10. Pipette carefully 100 µl of SUB into each well.
11. Incubate without shaking for 15 minutes at 20-25°C in the dark during which time a blue colour will develop.

12. Stop the substrate reaction by careful addition of 100 µl of **STOP** to each well (this will cause the blue colour to turn yellow) and shake the plate for about 5 seconds on a plate shaker to ensure uniformity of the solution in each well. *It is important to ensure that the substrate incubation time (i.e. time from addition of **SUB** to addition of **STOP**) is the same for each well.*
13. Using a microplate reader measure the absorbance of each well at 450 nm within 10 minutes after adding the stop solution (reference 620 – 650 nm, overrange 405 nm).

or automated on:

- **IASON[®] miniLisa**
- **IASON[®] PersonalLab**
- **IASON[®] Gladiator**

Recovery test procedure

1. Mix **30 µl** of the reconstituted **RC** with **300 µl** of **DIL** to obtain the **recovery control (RCC)**.
2. Mix **30 µl** of the **RC** with **300 µl** of each **patient working serum** to obtain the “**recovery patient sample**” (**RCPS**). Pipette (in duplicate) each **RCPS** next to the corresponding patient serum.

Quality Control

The regular use of control samples at several analyte levels is advised to ensure day-to-day validity of results. Two positive kit controls are provided. The controls should be tested as unknowns. Quality Control charts should be maintained to follow the assay performance.

Calculation of Results

- Plot a calibration curve by using the absorbance at 450 nm on a vertical linear or log scale axis and Tg concentrations on a log scale horizontal axis. Use the calibration curve to read off the concentrations of Tg in the patient samples and kit controls.
- Alternative data reduction techniques may be employed but users should confirm that the selected curve fit is appropriate and gives acceptable results. 4 Parameter Logistics or Point to Point curve fits are recommended.

Recovery test calculation

The % recovery is calculated as 100 x the ratio of observed increase in Tg concentration on addition of recovery concentration to expected increase in Tg concentration as follows:

$$100 \times \frac{RCSS \text{ (ng / ml)} - \text{Sample (ng / ml)}}{RCC \text{ (ng / ml)}} = \% \text{ Recovery}$$

In general, recovery results between 70 and 130 % are considered correct.

Interference from Tg-Antibodies

Autoantibodies to Tg are common in at least 15% of patients with differentiated thyroid carcinoma and are known to interfere with Tg measurements. Although this interference is reduced within the assay design of the EIASON[®] TgCa, the assessment of Tg-Antibodies in the patient sera is strongly recommended. Undetectable Tg levels are to be taken with great caution in the presence of Tg-Antibodies even in case of a normal Tg recovery result.

Expected Values

- Differentiated thyroid carcinoma in complete remission after total thyroid ablation:**
 Below 0.5 – 1 ng/ml on TSH-suppressive thyroid hormone treatment, no Tg- increase under TSH-stimulation.

Tg-values above this “grey zone” (particularly in case of TSH-suppressive treatment) strongly indicate the necessity of extensive diagnostic investigations.

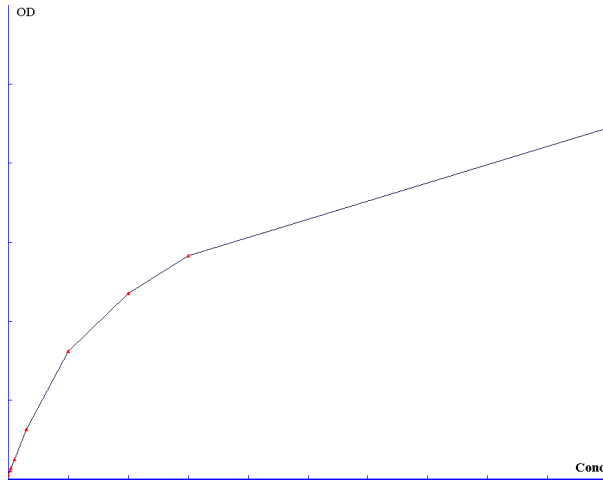
Example Assay Data

Typical results obtained with EIASON[®] TgCa calibrators:

CAL1 – CAL9 ng/ml	Absorbance at 450 nm
0	0.080
0.03	0.146
0.05	0.200
0.1	0.322
0.3	0.730
1.0	1.800
2.0	2.623
3.0	3.118
10.0	3.940

This data is for illustration only and must not be used for the calculation of any sample result.

Typical Calibration Curve



This sample calibration curve is for illustration only.

Assay precision and sensitivity

Analytical sensitivity: 0.002 ng/ml Tg

Defined as two standard deviations above the mean of repeatedly (20 times) measured zero standard. This defined limit of sensitivity is equivalent to the least significant range.

Functional Assay Sensitivity: 0.02 ng/ml Tg

Defined as the lowest concentration for which either the Inter-Assay variation is below 20% or the Intra-Assay variation below 10%.

Assay specificity

The falsification of any Tg determination by specifically and unspecifically acting serum factors cannot be excluded. Therefore, every Tg value has to be checked for accuracy by means of the recovery test.

High dose hook effect

Serum samples up to concentrations of 4000 ng/ml Tg were measured and no effect was observed.

Useful publications

1. Schlumberger M and Baudin E. Serum thyroglobulin determination in the follow-up of patients with differentiated thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology* (1998) 138:249-252.
2. Zöphel K, Wunderlich G, Liepach U, Koch R, Bredow J, and Franke - G. Recovery-test or immunoradiometric measurement of anti-thyroglobulin autoantibodies. *Nuklearmedizin* (2001) 40:155-163.
3. Pfannenstiel P. Is the determination of Thyroglobulin (Tg) indicated in non malignant thyroid disorders?. *Der Nuklearmediziner* (1991) 3,14:153-157.
4. Mazzaferri R. et al. A Consensus Report of the Role of Serum Thyroglobulin as a Monitoring Method for Low-Risk Patients with Papillary Thyroid Carcinoma. *J.Clin. Endocrinology. & Metabolism* (2003) 88(4):1433-1441.

Pipetting scheme

1. Preparation of the recovery sera.

A	CO1, CO2	DIL CO1, CO2	990 µl 10 µl
B.Pipetting		DIL RC	300µl 30µl
	RCC		
C.Pipetting		Sample RC	300 µl 30 µl
	RCPS		

2. Test procedure, optionally automated

1.Pipetting	START	25 µl	
2.Pipetting	CAL1 – CAL9 25 µl	CO1, CO2, Patient sample, RCC 25 µl	RCPS 25 µl
3.Incubation	2 hours at room temperature (20-25°C) on a shaker		
4.Washing	wash 3 times: aspirate or decant add 350 µl WASH repeat wash step 2 x dry on absorbant material		
5.Pipetting	CONJ	200 µl	
6.Incubation	17-21 hours at room temperature (20-25°C)		
7.Washing	see step 4		
8.Pipetting	SUB	100 µl	
9.Incubation	15 minutes at room temperature in the dark (20-25°C)		
10.Pipetting	STOP	100 µl	
11.Reading	450nm (RF 620nm) Overrange Filter: 405nm, Factor: 3 (dependent on photometer), reading within 10 min. Calculation: 4-parameter or point to point		

Expected values

	ngTg/ml
Analytical assay sensitivity	0.002