

EN



## Anti-Thyroid Peroxidase (TPO) Antibody ELISA

IVD

CLIA Complexity: High  
CDC Analyte Identification Code: 6135  
CDC Test System Identification Code: 28442

### PRODUCT INSERT

REF 1132 TPO Antibody ELISA 96 Determinations

#### INTENDED USE

An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the qualitative detection and quantitation of autoantibodies against TPO in human serum to aid in the diagnosis of certain thyroid disorders - *Hashimoto's*, *Grave's disease* and non-toxic goiter.

#### SUMMARY AND EXPLANATION

The clinical spectrum of autoimmune thyroid disorders is broad and the affected patient may be either hyper, hypo or even euthyroid. There are two major forms of autoimmune thyroid disorders, *Grave's disease* and *Hashimoto's thyroiditis*. Thyroid autoimmune reactions can also occur in other thyroid abnormalities such as sporadic and endemic goiter, Plummer's disease and endocrine ophthalmopathy<sup>1-5</sup>.

Patients with these disorders are often associated with the presence of autoantibodies to thyroglobulin and thyroid peroxidase (TPO) antigens. Thyroglobulin (Tg) is a 660 kD homodimeric glycoprotein which functions as thyroid prohormone. TPO is a membrane bound enzyme of 105 kD that catalyses thyroid hormone biosynthesis. Thyroxine and tri-iodo thyronine are generated by the TPO catalysed iodination and coupling at specific homogenic tyrosines. Measurement of autoantibodies to thyroglobulin and TPO are important in the diagnosis of autoimmune thyroid diseases. These antibodies can be measured by various methods such as indirect immunofluorescence, passive hemagglutination and ELISA.

#### PRINCIPLES OF PROCEDURE

The ELISA is performed as a solid phase immunoassay. Microwells are coated with native TPO antigen followed by blocking the unreacted sites to reduce non-specific binding. Controls, calibrators and patient serum samples are incubated in the antigen coated wells which allows specific antibodies present in the serum to bind to the TPO antigen. Unbound antibody and other serum proteins are removed by washing the microwells.

Bound antibodies are detected by adding an enzyme labeled anti-human IgG conjugate to the microwells. Unbound conjugate is removed by washing.

Specific enzyme substrate (pNPP) is then added to the wells and the presence of antibodies is detected by a color change produced by the conversion of pNPP substrate to a colored reaction product. The reaction is stopped and the intensity of the color change, which is proportional to the concentration of antibody, is read by a spectrophotometer at 405 nm. Results are expressed in International units per milliliter (IU/ml).

#### REAGENTS

##### Storage and Preparation

Store all reagents at 2° - 8°C. **Do not freeze.**

Do not use if reagent is not clear or if a precipitate is present. All reagents must be brought to room temperature (20°-25°C) prior to use.

When stored at 2° - 8°C, the reconstituted wash buffer is stable until the kit expiration date. Reconstitute the wash buffer to 1 liter with distilled or deionized water.

Coated microwell strips are for one time use only.

### Precautions

For *in vitro* Diagnostic Use. All human derived components used have been tested for HBsAg, HCV, HIV-1 and 2 and HTLV-I and found negative by FDA required tests. However human blood derivatives and patient specimens should be considered potentially infectious. Follow good laboratory practices in storing, dispensing and disposing of these materials<sup>6</sup>.

WARNING - Sodium azide (NaN<sub>3</sub>) may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. Upon disposal of liquids, flush with large volumes of water to prevent azide buildup. Sodium azide may be toxic if ingested. If ingested, report incident immediately to laboratory director or poison control center.

**Instructions should be followed exactly as they appear in this kit insert to ensure valid results.** Do not interchange kit components with those from other sources other than the same catalog number from Immco Diagnostics Inc. Follow good laboratory practices to minimize microbial and cross contamination of reagents when handling. Do not use beyond expiration date on the label.

### Materials provided

Immulin™ TPO Antibody ELISA **REF** 1132









Kits contain sufficient reagents to perform 96 determinations each.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>TPO</b>	<b>Microplate</b> with individual breakaway microwells coated with TPO antigen.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR A</b> <b>TPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator A</b> ( <i>green cap</i> ). Human serum containing antibodies to TPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR B</b> <b>TPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator B</b> ( <i>violet cap</i> ). Human serum containing antibodies to TPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR C</b> <b>TPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator C</b> ( <i>blue cap</i> ). Human serum containing antibodies to TPO.
1 x 1.5 ml	<b>CALIBRATOR D</b> <b>TPO</b> *	Ready to use <b>Calibrator D</b> ( <i>yellow cap</i> ). Human serum containing antibodies to TPO.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL +</b> <b>TPO</b> *	Ready to use <b>Positive Control</b> ( <i>red cap</i> ). Contains human serum positive for TPO antibodies.
1 x 1.5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Ready to use <b>Negative Control</b> ( <i>whitecap</i> ). Contains human serum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	Ready to use <b>anti-human Alk. Phos. Conjugate</b> . Color coded pink.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Ready to use <b>Serum Diluent</b> . Color coded blue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Ready to use <b>Enzyme Substrate</b> . Contains pNPP. <b>Protect from light.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Ready to use <b>Stop Solution</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Powder Wash Buffer</b> . Reconstitute to one liter each.

\* Contains <0.1% NaN<sub>3</sub>

EN

**Symbols used on labels:**

-  Lot number
-  Catalog number
-  Use by
-  Storage temperature
-  Read instructions for use
-  In vitro diagnostic use
-  Manufacturer
-  Number of Tests

**Materials Required But Not Provided**

- Deionized or distilled water
- Squeeze bottle to hold diluted wash buffer
- Pipettes capable of delivering 5 µl to 1000 µl
- Disposable pipette tips
- Clean test tubes 12 x 75 mm and test tube rack
- Timer
- Absorbent paper towels
- Microplate reader capable of reading absorbance values at 405 nm. If dual wavelength microplate reader is available, the reference filter should be set at 600-650 nm.
- Automatic microplate washer capable of dispensing 200 µl

**SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING**

Only serum specimens should be used in this procedure. Grossly hemolyzed, lipemic or microbially contaminated specimens may interfere with the performance of the test and should not be used. Store specimens at 2°- 8°C for no longer than one week. For longer storage, serum specimens should be frozen. Avoid repeated freezing and thawing of samples.

**PROCEDURE**

**Procedural Notes**

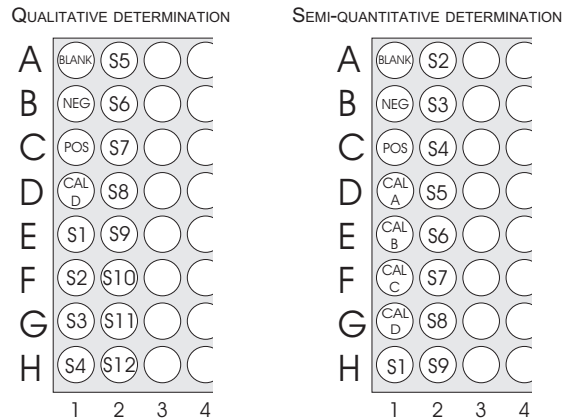
- Before starting with the assay read carefully the product insert.
- Let serum specimens and test reagents equilibrate at room temperature before starting with the test procedure. Return all unused specimens and reagents to refrigerator immediately after use.
- All dilutions of the patient samples should be prepared prior to starting with the assay.
- Good washing technique is critical. If washing is performed manually, adequate washing is accomplished by directing a forceful stream of wash buffer with a wide tip wash bottle across the entire microplate. **An automated microplate washer is recommended.**
- Use a multichannel pipette capable of delivering 8 wells simultaneously. This speeds the process and provides for a more uniform incubation time.
- For all steps, careful control of timing is important. The start of all incubation periods begins with the completion of reagent addition.

EN

- Addition of all samples and reagents should be performed at the same rate and in the same sequence.
- Remove required microwell strips from the pouch and carefully reseal the pouch to prevent condensation in the unused wells. Return pouch immediately to refrigerator.

### Test Method

- Step 1** Let all reagents and specimens equilibrate at room temperature.
- Step 2** Label protocol sheet to indicate sample placement in the wells. It is good laboratory practice to run samples in duplicate.
- Step 3** For a **qualitative determination** use only the Ready to Use Low Calibrator D (*vial with yellow cap*).  
**or** For a **semi-quantitative determination** use the Ready to Use Calibrators A through D as depicted in the sample layout below.



- Step 4** Prepare a **1:201** dilution of the patient samples by mixing **5 µl** of the patient sera with **1.0 ml** of Serum Diluent.
- Step 5** Remove the required microwells from pouch and return unused strips in the sealed pouch to refrigerator. Securely place the microwells into the extra provided holder .
- Step 6** Pipette **100 µl** of Ready to use Calibrators, Positive and Negative controls and diluted patient samples to the appropriate microwells as per protocol sheet.  
**Note:** Include one well which contains **100 µl** of the Serum Diluent as a reagent blank. Zero the ELISA reader against the reagent blank.
- Step 7** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 8** Wash **4x** with wash buffer. For manual washing, fill each microwell with reconstituted wash buffer. Discard the fluid by inverting and tapping out the contents of each well or by aspirating the liquid from each well. To blot at the end of the last wash, invert strips and tap the wells vigorously on absorbent paper towels. For automatic washers, program the washer as per manufacturer's instructions.
- Step 9** Pipette **100 µl** of Conjugate into microwells.
- Step 10** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 11** Wash all microwells as in Step 8.
- Step 12** Pipette **100 µl** of Enzyme Substrate into each microwell in the same order and timing as for the Conjugate.
- Step 13** Incubate **30 minutes** (± 5 min) at room temperature.
- Step 14** Pipette **100 µl** of Stop Solution into each microwell using the same order and timing as for the addition of the Enzyme Substrate. Read absorbance values within 1 hour from adding Stop Solution.
- Step 15** Read absorbance of each microwell at **405 nm** using a single or 405/630nm dual wavelength microplate reader against the reagent blank set at zero absorbance.

**Quality Control**

Calibrators, Positive and Negative Controls and a reagent blank must be run with each assay to verify the integrity and accuracy of the test. The absorbance reading of the reagent blank should be <0.3. The Calibrator A should have an absorbance reading of not less than 1.0, otherwise the test must be repeated. The negative control must be <20 IU/ml. If the test is run in duplicate, the mean of the two readings should be taken for determining IU/ml. When performing Qualitative determinations, the optical density of the Calibrator D must be greater than that of the negative control and lesser than the absorbance of the positive control. For semi-quantitative determinations, the positive control must give values in the range stated on the vial.

**RESULTS**

**Calculations**

The concentrations of the patient samples can be determined by either of two methods:

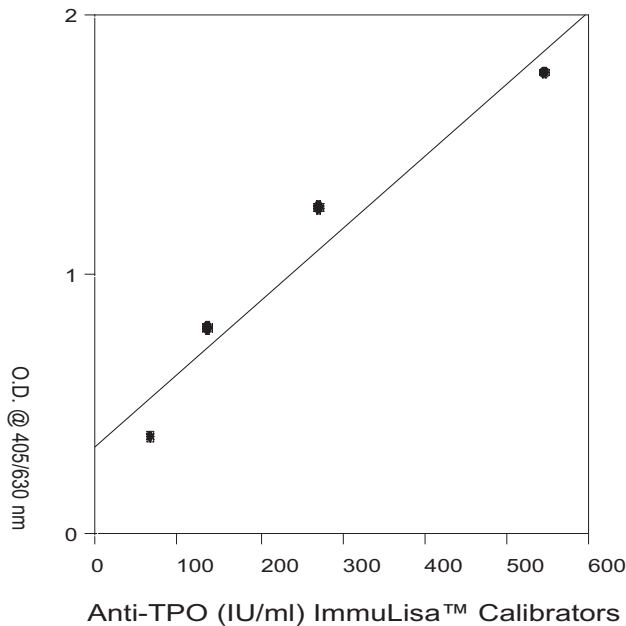
**1. QUALITATIVE DETERMINATION**

$$\frac{\text{Abs. of Test Sample}}{\text{Abs. of Calibrator D}} \times \text{IU/ml of Calibrator D} = \text{IU/ml Test Sample}$$

**2. SEMI-QUANTITATIVE DETERMINATION**

Plot absorbance of Calibrator A through D against their respective concentration on a linear-linear graph paper. Plot the concentration in IU/ml on the X-axis against the absorbance on the Y-axis and draw the best fit curve. Determine the concentrations of the patient samples from the curve against its corresponding absorbance value.

Anti-TPO (IU/ml) Immulisa™ Standard Curve



**Calibrator**

The Ready to Use Calibrators are included to provide semi-quantitation and must be used with each run. Patient samples containing higher antibody levels may give absorbance values greater than that of the Calibrator A. For determining accurate semi-quantitative values such serum sample should be further diluted so they fall within the range of the calibrator curve when retested. For determining IU/ml, multiply the units obtained by the dilution factor.

**Interpretation**

The following serves only as a guide in the interpretation of the laboratory results. These values were determined by testing 80 normal blood donors. The values depicted below are the mean of the normal plus 2SD. Each laboratory must determine its own normal values.

Anti-TPO values	Interpretation
≤20 IU/ml	Negative
>20 IU/ml	Positive

**LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

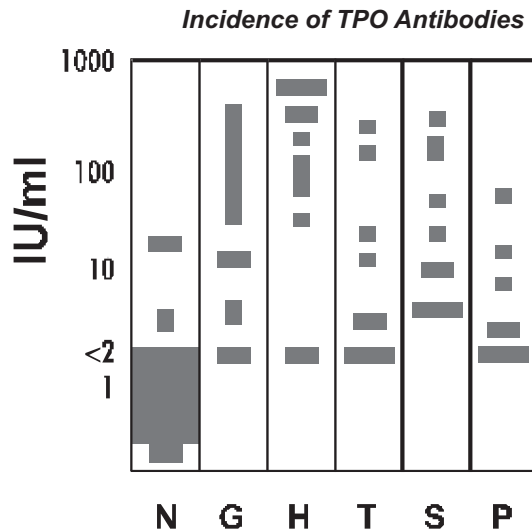
Thyroid autoantibodies may also be present in non-thyroid disorders. Test results obtained by this assay alone are not diagnostic for thyroid disease and should be considered in conjunction with iodine uptake and other standard thyroid tests and the clinical presentation of the patient.

**EXPECTED VALUES**

The expected values in a normal population are negative. However, 5-10% of apparently healthy, asymptomatic individuals may test positive for thyroid autoantibodies. The incidence of these autoantibodies increases with age. The following table and figure depicts the incidence of thyroid autoantibodies in normals and in various disease states using Immulisa™ antigen plates. Antibodies to TPO occur primarily in *Grave's*, *Hashimoto's*, toxic nodular goiter and in association with certain other autoimmune disorders, such as SLE.

**Significance of Thyroid Antibodies**

Ab Specificity	Disease Association	Indications for use
<b>Thyroglobulin (Tg)</b>	1) thyroid autoimmune diseases 2) incorrect thyroglobulin levels	complement to thyroglobulin levels
<b>Microsomal (TPO)</b>	Thyroid autoimmune disease	1) Goiter of unknown etiology 2) Hyperthyroidism



*N=Normals (99), G=Grave's (25), H=Hashimoto's (15), T=Toxic Multi Nodular Goiter (11), S=SLE (20), P=Primary Biliary Cirrhosis (9)*

**PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

Results obtained with the Immulisa™ anti-TPO ELISA were compared with another commercially manufactured assay.

		Immulisa™		Total
		Positive	Negative	
Other ELISA	Positive	42	14	56
	Negative	4	62	66
	Total	46	76	122

Relative Agreement: 85.2%

Relative Sensitivity: 75%

Relative Specificity: 94%

**Precision:**

Three different anti-TPO antibody positive sera were tested with the Immulisa™ anti-TPO ELISA to determine inter- and intra-assay variability based on 10 replicates. The results are listed below:

	mean value IU/ml	inter-assay %CV	intra-assay %CV
Sample 1	196.6	10.8	6.6
Sample 2	155.8	12.3	8.0
Sample 3	110.9	18.0	7.5

**Recovery:**

Samples with known anti-TPO antibody concentrations were mixed with appropriate dilutions of another positive sample with known amounts. Anti-TPO antibody levels of the mixed samples were determined and from the values obtained the percent recovery calculated. The results are as follows:

	TPO-Ab conc. added (IU/ml)	TPO-Ab conc. obtained (IU/ml)	% Recovery
Sample 1	275.0	244.3	88.9
Sample 2	183.0	175.3	95.8
Sample 3	116.0	107.0	92.2



## Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO)

IVD

### ΕΝΘΕΤΟ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ

REF 1132 Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) 96 Προσδιορισμοί

#### ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ

Μια μέθοδος ενζυμικού ανοσοπροσροφητικού προσδιορισμού (ELISA) για την ποιοτική ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό αυτοαντισωμάτων κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) σε ορό ανθρώπου, για την υποβοήθηση της διάγνωσης συγκεκριμένων θυρεοειδικών διαταραχών – της νόσου *Hashimoto*, της νόσου *Grave* και της μη τοξικής βρογχοκήλης.

#### ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ

Το κλινικό φάσμα των αυτοάνοσων θυρεοειδικών διαταραχών είναι ευρύ και οι αντίστοιχοι ασθενείς ενδέχεται να είναι υπερ-, υπο- ή ακόμη και ευθυρεοειδικοί. Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι αυτοάνοσων θυρεοειδικών διαταραχών, η νόσος *Grave* και η *θυρεοειδίτιδα Hashimoto*. Θυρεοειδείς αυτοάνοσες αντιδράσεις μπορούν επίσης να εμφανιστούν και σε άλλες θυρεοειδικές ανωμαλίες, όπως η σποραδική και η ενδημική βρογχοκήλη, η νόσος *Plummer* και η ενδοκρινική οφθαλμοπάθεια<sup>1-5</sup>.

Σε αυτούς τους ασθενείς οι διαταραχές συχνά σχετίζονται με την παρουσία αυτοαντισωμάτων κατά των αντιγόνων της θυρεοσφαιρίνης και της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO). Η θυρεοσφαιρίνη (Tg) είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεΐνη μοριακού βάρους 660 kD, η οποία δρα ως θυρεοειδική προορμόνη. Η TPO είναι ένα δεσμευμένο στη μεμβράνη ένζυμο μοριακού βάρους 105 kD, το οποίο καταλύει τη βιοσύνθεση της θυρεοειδικής ορμόνης. Η θυροξίνη και η τρι-ιωδο-θυρονίνη δημιουργούνται με ιωδίωση και σύζευξη σε συγκεκριμένες ομογενείς τυροσίνες, αντιδράσεις που καταλύονται από την TPO. Η μέτρηση των αυτοαντισωμάτων κατά της θυρεοσφαιρίνης και της TPO είναι σημαντική για τη διάγνωση των αυτοάνοσων θυρεοειδικών διαταραχών. Τα αντισώματα αυτά μπορούν να μετρηθούν με διάφορες μεθόδους, όπως είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός, η παθητική αιμοσυγκόλληση και η ανάλυση ELISA.

#### ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Η ανάλυση ELISA διενεργείται ως ανοσοπροσδιορισμός στερεάς φάσης. Οι μικροκυψελίδες επικαλύπτονται με φυσικό αντιγόνο TPO και, στη συνέχεια, τα σημεία που δεν θα παρουσιάσουν αντίδραση αποκλείονται ώστε να μειωθεί η μη ειδική δέσμευση. Τα διαλύματα ελέγχου, οι βαθμονομητές και τα δείγματα ορού ασθενών επωάζονται στις επικαλυμμένες με το αντιγόνο κυψελίδες, επιτρέποντας έτσι τη δέσμευση όλων των ειδικών αντισωμάτων του ορού στο αντιγόνο TPO. Τα αντισώματα που δεν δεσμεύτηκαν, καθώς και άλλες πρωτεΐνες του ορού, απομακρύνονται με έκπλυση των μικροκυψελίδων.

Τα αντισώματα που δεσμεύτηκαν ανιχνεύονται με την προσθήκη στις μικροκυψελίδες σημασμένου με ένζυμο συζευκτικού αντισώματος κατά της ανθρώπινης IgG. Το μη δεσμευμένο συζευκτικό αντίσωμα απομακρύνεται με έκπλυση.

Στη συνέχεια, προστίθεται στις κυψελίδες το ειδικό υπόστρωμα του ενζύμου (pNPP) και ανιχνεύεται η παρουσία αντισωμάτων με την αλλαγή χρώματος που προκύπτει λόγω της μετατροπής του υποστρώματος pNPP σε ένα έγχρωμο προϊόν αντίδρασης. Η αντίδραση τερματίζεται και η ένταση της αλλαγής του χρώματος, η οποία είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αντισώματος, ανιχνεύεται από ένα φασματοφωτόμετρο, σε μήκος κύματος 405 nm. Τα αποτελέσματα εκφράζονται σε διεθνείς μονάδες ανά χιλιοστόλιτρο (IU/ml).

#### ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

##### Φύλαξη και προετοιμασία

Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2 - 8°C. **Μην τα καταψύχετε.**

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια εάν δεν είναι διαυγή ή εάν περιέχουν ίζημα. Όλα τα αντιδραστήρια πρέπει να φτάσουν σε θερμοκρασία δωματίου (20-25°C) πριν από τη χρήση.

EL

Όταν φυλάσσεται σε θερμοκρασία 2-8 °C, το ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης παραμένει αναλλοίωτο μέχρι την ημερομηνία λήξης του kit. Η ανασύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος πρέπει να γίνεται με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό, σε όγκο 1 λίτρου.

Οι επικαλυμμένες ταινίες μικροκυψελίδων προορίζονται για μία μόνο χρήση.

### Προφυλάξεις

Για *in vitro* διαγνωστική χρήση. Όλα τα συστατικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιούνται έχουν ελεγχθεί για την παρουσία του αντιγόνου HBsAg, των ιών HCV, HIV-1 και 2, καθώς και του ιού HTLV-I και έχουν βρεθεί αρνητικά, σύμφωνα με τις εξετάσεις που απαιτεί ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA). Ωστόσο, τα παράγωγα ανθρώπινου αίματος και τα δείγματα ασθενών θα πρέπει να θεωρούνται ως δυνητικά λοιμογόνα. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές κατά τη φύλαξη, την έγχυση και την απόρριψη των υλικών αυτών<sup>6</sup>.

**ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ** – Το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) ενδέχεται να αντιδράσει με σωληνώσεις από μόλυβδο ή χαλκό και να σχηματίσει ισχυρώς εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά την απόρριψη υγρών, εκπλύνετε με μεγάλες ποσότητες νερού, έτσι ώστε να αποφευχθεί η συσσώρευση αζιδίων. Το αζίδιο του νατρίου ενδέχεται να είναι τοξικό σε περίπτωση κατάποσης. Σε περίπτωση κατάποσης, αναφέρετε αμέσως το περιστατικό στο διευθυντή του εργαστηρίου ή στο κέντρο ελέγχου δηλητηριάσεων.

**Για τη διασφάλιση έγκυρων αποτελεσμάτων, ακολουθήστε τις οδηγίες ακριβώς όπως εμφανίζονται σε αυτό το ένθετο του kit.** Μην εναλλάσσετε τα συστατικά του kit με συστατικά άλλης προέλευσης που δεν έχουν τον ίδιο αριθμό καταλόγου της Immco Diagnostics Inc. Ακολουθήστε τις ορθές εργαστηριακές πρακτικές για να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος μικροβιακής ή διασταυρούμενης μόλυνσης των αντιδραστηρίων κατά το χειρισμό τους. Να μην χρησιμοποιείται μετά την παρέλευση της ημερομηνίας λήξης που αναγράφεται στην ετικέτα.

### Υλικά που παρέχονται

Μέθοδος ELISA για αντισώματα κατά της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) ImmuLisa™ **REF** 1132

Κάθε kit περιέχει επαρκή αντιδραστήρια για την εκτέλεση 96 προσδιορισμών.

12 x 8	<b>MICROPLATE TPO</b>	<b>Πλακίδιο</b> ξεχωριστών αποσπώμενων μικροκυψελίδων επικαλυμμένων με αντιγόνο TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A TPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής A</b> (πράσινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B TPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής B</b> (ιώδες πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C TPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής C</b> (μπλε πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D TPO</b> *	Έτοιμος προς χρήση <b>Βαθμονομητής D</b> (κίτρινο πώμα). Ορός ανθρώπου που περιέχει αντισώματα κατά της TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + TPO</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα θετικού ελέγχου</b> (κόκκινο πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου θετικό για τα αντισώματα κατά της TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>διάλυμα αρνητικού ελέγχου</b> (λευκό πώμα). Περιέχει ορό ανθρώπου.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPPOS</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>συζευκτικό αντίσωμα κατά της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης συζευγμένο με αλκαλική φωσφατάση</b> . Χρώματος ροζ.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Έτοιμο προς χρήση <b>αραιωτικό διάλυμα ορού</b> . Χρώματος μπλε.

EL

1 x 12 ml **SUBSTRATE** \*

Έτοιμο προς χρήση **ενζυμικό υπόστρωμα**. Περιέχει p-νιτροφαινυλική φωσφατάση (pNPP). Να προστατεύεται από το φως.

1 x 12 ml **STOP**

Έτοιμο προς χρήση **διάλυμα τερματισμού**.

2 x **BUF WASH**

**Σκόνη ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης**. Η ανασύσταση πρέπει να γίνεται έως όγκο ενός λίτρου για το καθένα.

\* Περιέχει < 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Σύμβολα που χρησιμοποιούνται στις ετικέτες:

**LOT** Αριθμός παρτίδας

**REF** Αριθμός καταλόγου

 Ημερομηνία λήξης

 Θερμοκρασία αποθήκευσης

 Διαβάστε τις οδηγίες χρήσης

**IVD** In vitro διαγνωστική χρήση

 Κατασκευαστής

 Αριθμός αναλύσεων

#### Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

- Απιονισμένο ή απεσταγμένο νερό
- Εύκαμπτη πλαστική φιάλη για το αραιωμένο ρυθμιστικό διάλυμα
- Πιπέτες με δυνατότητα χορήγησης 5 μl έως 1000 μl
- Αναλώσιμα ακροφύσια πιπेटών
- Καθαροί δοκιμαστικοί σωλήνες διαστάσεων 12 x 75 mm και φορέας δοκιμαστικών σωλήνων
- Χρονομετρητής
- Απορροφητικά χαρτιά
- Συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων με δυνατότητα ανάγνωσης τιμών απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Εάν υπάρχει διαθέσιμη συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων διπλού μήκους κύματος, το φίλτρο αναφοράς θα πρέπει να ρυθμιστεί στα 600-650 nm.
- Αυτόματη συσκευή έκπλυσης πλακιδίων με δυνατότητα χορήγησης 200 μl

#### ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο δείγματα ορού για αυτή τη διαδικασία. Δείγματα που έχουν υποστεί μεγάλο βαθμού αιμόλυση, λιπαιμικά ή δείγματα μολυσμένα με μικρόβια ενδέχεται να επηρεάσουν την απόδοση της ανάλυσης και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούνται. Φυλάξτε τα δείγματα σε θερμοκρασία 2°- 8°C, επί όχι περισσότερο από μία εβδομάδα. Για πιο μακροχρόνια φύλαξη, τα δείγματα ορού θα πρέπει να καταψύχονται. Αποφύγετε την επαναλαμβανόμενη κατάψυξη και απόψυξη των δειγμάτων.

#### ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

##### Σημειώσεις της διαδικασίας

- Προτού ξεκινήσετε την ανάλυση, διαβάστε προσεκτικά το ένθετο προϊόντος.

- Αφήστε τα δείγματα ορού και τα αντιδραστήρια της ανάλυσης να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προτού ξεκινήσετε τη διαδικασία της ανάλυσης. Επιστρέψτε όλα τα μη χρησιμοποιημένα δείγματα και αντιδραστήρια στο ψυγείο αμέσως μετά τη χρήση τους.
- Όλες οι αραιώσεις των δειγμάτων ασθενών πρέπει να προετοιμαστούν προτού ξεκινήσει η ανάλυση.
- Είναι σημαντική η χρήση ορθής τεχνικής έκπλυσης. Εάν η έκπλυση δεν εκτελείται αυτόματα, επαρκής έκπλυση επιτυγχάνεται κατευθύνοντας μια ισχυρή ριπή ρυθμιστικού διαλύματος έκπλυσης από μια φιάλη έκπλυσης με ευρύ ακροφύσιο κατά μήκος ολόκληρου του πλακιδίου. **Συνιστάται η χρήση αυτόματης συσκευής έκπλυσης πλακιδίων.**
- Χρησιμοποιήστε μια πολυκάναλη πιπέτα με δυνατότητα ταυτόχρονης χορήγησης σε 8 κυψελίδες. Με τον τρόπο αυτό, επιταχύνεται η διαδικασία και επιτυγχάνεται πιο ομοιόμορφος χρόνος επώασης.
- Σε όλα τα βήματα είναι σημαντικός ο προσεκτικός έλεγχος των χρόνων. Όλες οι περίοδοι επώασης ξεκινούν με την ολοκλήρωση της προσθήκης του αντιδραστηρίου.
- Η προσθήκη όλων των δειγμάτων και αντιδραστηρίων πρέπει να γίνεται με τον ίδιο ρυθμό και με την ίδια σειρά.
- Αφαιρέστε από τη θήκη τις απαιτούμενες ταινίες μικροκυψελίδων και επανασφραγίστε προσεκτικά τη θήκη ώστε να αποτραπεί τυχόν συμπίκνωση υδρατμών στις αχρησιμοποίητες μικροκυψελίδες. Επιστρέψτε αμέσως τη θήκη στο ψυγείο.

### Μέθοδος ανάλυσης

- Βήμα 1** Αφήστε όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα να φτάσουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Βήμα 2** Σημάνετε το φύλλο του πρωτοκόλλου ώστε να υποδεικνύεται η τοποθέτηση των δειγμάτων στις μικροκυψελίδες. Η ανάλυση των δειγμάτων εις διπλούν αποτελεί ορθή εργαστηριακή πρακτική.
- Βήμα 3** Για **ποιοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε μόνο τον έτοιμο προς χρήση Βαθμονομητή D (φιαλίδιο με κίτρινο πώμα)  
ή Για **ημι-ποσοτικό προσδιορισμό** χρησιμοποιήστε τους έτοιμους προς χρήση Βαθμονομητές A έως D, όπως απεικονίζεται στην παρακάτω διαμόρφωση δειγμάτων.

ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
			1	2

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
			1	2

- Βήμα 4** Προετοιμάστε μια αραιώση των δειγμάτων ασθενών σε αναλογία **1:201**, αναμιγνύοντας **5 μl** του δείγματος του ασθενούς με **1,0 ml** του αραιωτικού διαλύματος ορού.
- Βήμα 5** Αφαιρέστε τις απαιτούμενες μικροκυψελίδες από τη θήκη και επιστρέψτε τυχόν μη χρησιμοποιημένες ταινίες που υπάρχουν στη σφραγισμένη θήκη στο ψυγείο. Τοποθετήστε σταθερά τις μικροκυψελίδες στο πλαίσιο στήριξης που διατίθεται.
- Βήμα 6** Προσθέστε **100 μl** έτοιμων προς χρήση βαθμονομητών, διαλυμάτων θετικού και αρνητικού ελέγχου και αραιωμένων δειγμάτων ασθενών στις κατάλληλες μικροκυψελίδες, όπως υποδεικνύεται στο φύλλο πρωτοκόλλου.

**Σημείωση:** Συμπεριλάβετε μια κυψελίδα με **100 μl** αραιωτικού διαλύματος ορού ως τυφλό αντιδραστήριου. Μηδενίστε τη συσκευή ανάγνωσης ELISA με το τυφλό αντιδραστήριου.

- Βήμα 7** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 8** Εκπλύνετε **4x** με το ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Για μη αυτόματη έκπλυση, πληρώστε κάθε μικροκυψελίδα με ανασυσταθέν ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης. Απορρίψτε το υγρό αναστρέφοντας το πλακίδιο και κτυπώντας το ελαφρά ώστε να αδειάσουν όλες οι κυψελίδες ή αναρροφώντας το υγρό από κάθε κυψελίδα. Για να στυπώσετε στο τέλος της τελευταίας έκπλυσης, αναστρέψτε τις ταινίες και κτυπήστε δυνατά τις κυψελίδες επάνω σε απορροφητικό χαρτί. Για αυτόματες συσκευές έκπλυσης, προγραμματίστε τη συσκευή σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.
- Βήμα 9** Προσθέστε **100 μl** συζευκτικού αντισώματος στις μικροκυψελίδες.
- Βήμα 10** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 11** Εκπλύνετε όλες τις μικροκυψελίδες όπως στο βήμα 8.
- Βήμα 12** Προσθέστε **100 μl** ενζυμικού υποστρώματος σε κάθε κυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το συζευκτικό αντίσωμα.
- Βήμα 13** Επωάστε επί **30 λεπτά** ( $\pm 5$  λεπτά) σε θερμοκρασία δωματίου.
- Βήμα 14** Προσθέστε **100 μl** διαλύματος τερματισμού σε κάθε μικροκυψελίδα, με την ίδια σειρά και με τους ίδιους χρόνους όπως το ενζυμικό υπόστρωμα. Διαβάστε τις τιμές απορρόφησης εντός 1 ώρας από την προσθήκη του διαλύματος τερματισμού.
- Βήμα 15** Διαβάστε την απορρόφηση κάθε κυψελίδας σε μήκος κύματος **405 nm** χρησιμοποιώντας μια συσκευή ανάγνωσης πλακιδίων μονού ή διπλού μήκους κύματος 405/630 nm, έναντι του τυφλού αντιδραστήριου που ρυθμίστηκε να έχει απορρόφηση μηδέν.

### Έλεγχος ποιότητας

Σε κάθε ανάλυση θα πρέπει να χρησιμοποιούνται βαθμονομητές, διαλύματα θετικού και αρνητικού ελέγχου και ένα τυφλό αντιδραστήριου, προκειμένου να επιβεβαιώνεται η ακεραιότητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Η μέτρηση απορρόφησης του τυφλού αντιδραστήριου πρέπει να είναι  $<0,3$ . Ο Βαθμονομητής A πρέπει να δώσει τιμή απορρόφησης όχι μικρότερη από 1,0, διαφορετικά η ανάλυση πρέπει να επαναληφθεί. Το διάλυμα αρνητικού ελέγχου πρέπει να δώσει τιμή  $<20$  IU/ml. Εάν η ανάλυση διεξάγεται εις διπλούν, χρησιμοποιήστε τη μέση τιμή των δύο μετρήσεων για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση των αντισωμάτων σε IU/ml. Κατά τη διεξαγωγή ποιοτικών προσδιορισμών, η οπτική πυκνότητα του Βαθμονομητή D πρέπει να είναι μεγαλύτερη από αυτήν του διαλύματος αρνητικού ελέγχου και μικρότερη από αυτήν του διαλύματος θετικού ελέγχου. Για ημι-ποσοτικούς προσδιορισμούς, το διάλυμα θετικού ελέγχου πρέπει να δίνει τιμές εντός του εύρους που αναγράφεται στο φιαλίδιο.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### Υπολογισμοί

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων του ασθενούς μπορούν να προσδιοριστούν με μία από τις εξής δύο μεθόδους:

#### 1. ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

##### Απ/ση εξεταζόμενου δείγματος

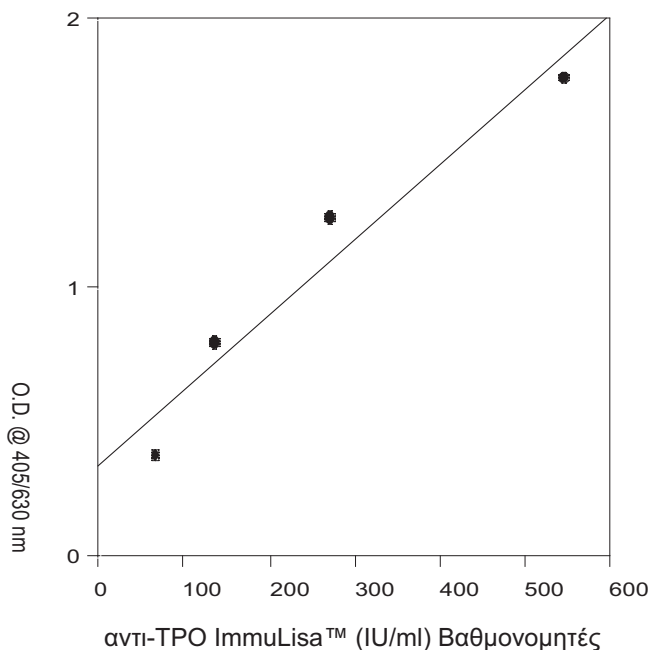
----- X IU/ml του Βαθμονομητή D = IU/ml του εξεταζόμενου δείγματος

##### Απ/ση του Βαθμονομητή D

#### 2. ΗΜΙ-ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ

Απεικονίστε σε γραφική παράσταση την απορρόφηση των Βαθμονομητών A έως και D ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωσή τους, σε ένα χαρτί με γραμμικούς άξονες. Τοποθετήστε στον άξονα των X τη συγκέντρωση σε IU/ml και στον άξονα των Y την απορρόφηση και σχεδιάστε την καμπύλη βέλτιστης προσαρμογής. Προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων των ασθενών από την καμπύλη, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές απορρόφησης τους.

αντι-TPO ImmuLisa™ Πρότυπη καμπύλη



### Βαθμονομητής

Οι έτοιμοι προς χρήση βαθμονομητές συμπεριλαμβάνονται για τον ημι-ποσοτικό προσδιορισμό και πρέπει να χρησιμοποιούνται σε κάθε ανάλυση. Τυχόν δείγματα ασθενών που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα αντισωμάτων ενδέχεται να δώσουν τιμές απορρόφησης υψηλότερες από αυτές του Βαθμονομητή Α. Για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών ημι-ποσοτικού προσδιορισμού, τα δείγματα αυτά θα πρέπει να αραιωθούν περαιτέρω, έτσι ώστε όταν επανεξεταστούν να εμπίπτουν εντός του εύρους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για να προσδιορίσετε τη συγκέντρωση σε IU/ml, πολλαπλασιάστε τις μονάδες που προκύπτουν με το συντελεστή αραιώσης.

### Ερμηνεία

Τα παρακάτω παρέχονται μόνον ως οδηγός στην ερμηνεία των εργαστηριακών αποτελεσμάτων. Αυτές οι τιμές προσδιορίστηκαν με την ανάλυση 80 φυσιολογικών αιμοδοτών. Οι τιμές που απεικονίζονται παρακάτω είναι η μέση τιμή των φυσιολογικών ατόμων συν 2 τυπικές αποκλίσεις. Το κάθε εργαστήριο πρέπει να προσδιορίσει τις δικές του φυσιολογικές τιμές.

#### Τιμές αντισωμάτων κατά της ΤΡΟ

<20 IU/ml

>20 IU/ml

#### Ερμηνεία

Αρνητικό

Θετικό

### ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ

Θυροειδικά αυτοαντισώματα ενδέχεται να εμφανίζονται και σε μη θυροειδικές διαταραχές. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή την ανάλυση δεν αποτελούν από μόνα τους διάγνωση για θυροειδική νόσο και θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με την πρόσληψη ιωδίου, καθώς και με άλλες τυπικές θυροειδικές εξετάσεις και με την κλινική εμφάνιση του ασθενούς.

## ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ

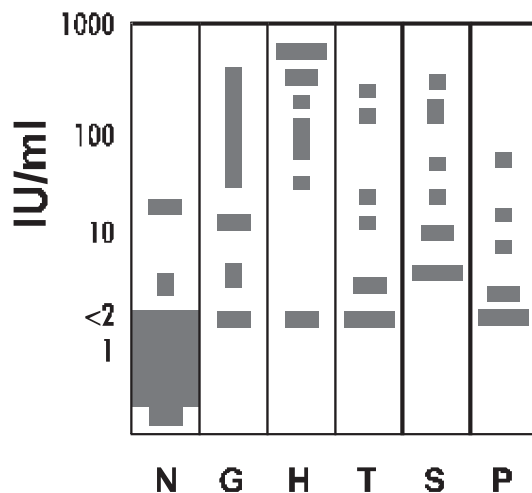
Οι αναμενόμενες τιμές σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό είναι αρνητικές. Ωστόσο, ένα 5-10% φαινομενικά υγιών, ασυμπτωματικών ατόμων ενδέχεται να δώσει θετικό αποτέλεσμα σε εξέταση για την παρουσία θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων. Η συχνότητα εμφάνισης αυτών των αυτοαντισωμάτων αυξάνεται με την ηλικία.

Ο παρακάτω πίνακας και η εικόνα απεικονίζουν τη συχνότητα εμφάνισης των θυρεοειδικών αυτοαντισωμάτων σε φυσιολογικά άτομα και σε διάφορα στάδια της νόσου, όπως προκύπτει χρησιμοποιώντας τα επικαλυμμένα με αντιγόνο πλακίδια Immulisa™. Αντισώματα κατά της TPO εμφανίζονται κυρίως στη νόσο *Grave*, στη νόσο *Hashimoto*, στην τοξική οζώδη βρογχοκήλη, καθώς και σε σχέση με ορισμένες άλλες αυτοάνοσες διαταραχές, όπως ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος.

### Σημασία των θυρεοειδικών αντισωμάτων

Ειδικότητα αντισωμάτων	Συσχέτιση με τη νόσο	Ενδείξεις χρήσης
<b>Θυρεοσφαιρίνης (Tg)</b>	1) αυτοάνοσες θυρεοειδικές νόσοι 2) μη φυσιολογικά επίπεδα θυρεοσφαιρίνης	συμπλήρωμα στα επίπεδα θυρεοσφαιρίνης
<b>Μικροσωμακά (TPO)</b>	Αυτοάνοση θυρεοειδική νόσος	1) Βρογχοκήλη αγνώστου αιτιολογίας 2) Υπερθυρεοειδισμός

### Συχνότητα εμφάνισης αντισωμάτων κατά της TPO



N=Φυσιολογικά άτομα (99), G=Νόσος του Grave (25), H=Θυρεοειδίτιδα Hashimoto (15), T=Τοξική πολυοζώδης βρογχοκήλη (11), S=Συστηματικός ερυθηματώδης λύκος (20), P=Πρωτοπαθής χολική κίρρωση (9)

## ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα κατά της TPO Immulisa™ συγκρίθηκαν με μια άλλη μέθοδο που διατίθεται στο εμπόριο.

EL

Άλλη ELISA	ImmuLisa™		Σύνολο
	Θετικά	Αρνητικά	
Θετικά	42	14	56
Αρνητικά	4	62	66
Σύνολο	46	76	122

Σχετική συμφωνία: 85,2%

Σχετική ευαισθησία: 75%

Σχετική ειδικότητα: 94%

#### Ακρίβεια:

Τρεις διαφορετικοί οροί θετικοί για τα αντισώματα κατά της ΤΡΟ αναλύθηκαν με τη μέθοδο ELISA για αντισώματα κατά της ΤΡΟ ImmuLisa™ προκειμένου να προσδιοριστεί η ποικιλότητα εντός σειράς και μεταξύ σειρών, με βάση 10 αντίγραφα. Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω:

	Μέση τιμή	Μεταξύ σειρών	Εντός σειράς
	IU/ml	%CV	%CV
Δείγμα 1	196,6	10,8	6,6
Δείγμα 2	155,8	12,3	8,0
Δείγμα 3	110,9	18,0	7,5

#### Ανάκτηση:

Δείγματα με γνωστές συγκεντρώσεις αντισωμάτων κατά της ΤΡΟ αναμίχθηκαν με κατάλληλες αραιώσεις ενός άλλου θετικού δείγματος που περιείχε γνωστές ποσότητες αντισωμάτων αντι-ΤΡΟ. Προσδιορίστηκαν τα επίπεδα αντισωμάτων κατά της ΤΡΟ στα αναμειχθέντα δείγματα και από τις τιμές που προέκυψαν υπολογίστηκε η επί τοις εκατό ανάκτηση. Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

	Συγκεντρ. αντι-ΤΡΟ		Ανάκτηση %
	προστιθέμενη (IU/ml)	ληφθείσα (IU/ml)	
Δείγμα 1	275,0	244,3	88,9
Δείγμα 2	183,0	175,3	95,8
Δείγμα 3	116,0	107,0	92,2

ES



## ELISA para anticuerpos antiperoxidasa tiroidea (TPO)

IVD

PROSPECTO

REF 1132 ELISA para anticuerpos anti TPO 96 análisis

### USO PREVISTO

Ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detección cualitativa y cuantificación de autoanticuerpos contra TPO en suero humano, como ayuda en el diagnóstico de determinados trastornos del tiroides: *enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Grave y bocio no tóxico*.

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El espectro clínico de los trastornos tiroideos autoinmunes es amplio; el paciente puede padecer hipertiroidismo o hipotiroidismo pero también ser eutiroideo. Las principales formas de trastornos tiroideos autoinmunes son dos: la *enfermedad de Grave* y la *enfermedad de Hashimoto*. Otras anomalías del tiroides pueden presentar también reacciones tiroideas autoinmunes, por ejemplo el *bocio esporádico y endémico, la enfermedad de Plummer y la oftalmopatía endocrina*<sup>1-5</sup>.

En los pacientes con estas patologías se observa frecuentemente la presencia de autoanticuerpos contra antígenos tiroglobulina y peroxidasa tiroidea (TPO). La tiroglobulina (Tg) es una glicoproteína homodimérica de 660 kD que funciona como una pro hormona tiroidea. La TPO es una enzima ligada a la membrana celular de 105 kD que cataliza la biosíntesis de la hormona tiroidea. La tiroxina y la triyodotironina resultan de la yodinación catalizada por la TPO y el acoplamiento a tirosinas homogénicas específicas. La medición de los autoanticuerpos antitiroglobulina y anti TPO es importante para el diagnóstico de las enfermedades tiroideas autoinmunes y puede efectuarse con diferentes métodos, tales como inmunofluorescencia indirecta, hemaglutinación pasiva y ELISA.

### PRINCIPIOS DEL PROCEDIMIENTO

ELISA es un inmunoensayo de fase sólida. Los pocillos se recubren con antígeno TPO nativo; a continuación se bloquean los puntos que no han reaccionado para reducir las uniones no específicas. En los pocillos recubiertos con antígeno se incuban los controles, calibradores y muestras de suero del paciente permitiendo que los anticuerpos específicos presentes en el suero se unan al antígeno TPO. Los anticuerpos que no se han unido y demás proteínas séricas se eliminan mediante lavado. Los anticuerpos unidos se revelan añadiendo a los pocillos un conjugado de IgG antihumana marcado con enzima. El conjugado no unido se elimina mediante lavado.

A continuación se añade a los pocillos un substrato enzimático específico (pNPP); la presencia de los anticuerpos es revelada por un cambio de color producido por la conversión del substrato pNPP en un producto de reacción coloreado. Se detiene entonces la reacción y se lee la intensidad del cambio de color, que es proporcional a la concentración de anticuerpos, mediante un espectrofotómetro a 405 nm. Los resultados se expresan en unidades internacionales por mililitro (IU/ml).

### REACTIVOS

#### Conservación y preparación

Conserve los reactivos a 2-8°C. **No los congele**. No utilice el reactivo si se presenta turbio o se advierten precipitados. En el momento de usarlos, los reactivos tienen que estar a temperatura ambiente (20-25°C). Conservado a 2-8°C, el tampón de lavado reconstituido permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. Reconstituya el tampón de lavado hasta 1 litro con agua destilada o desionizada. Las tiras de micropocillos recubiertos deben usarse una sola vez.

#### Precauciones

Para diagnóstico *in vitro*. Todo suero de donante empleado para fabricar este producto ha sido analizado mediante métodos aprobados por FDA y resultó negativo al anticuerpo anti HCV (HIV 1 e HIV 2), al antígeno de superficie

del virus de la hepatitis B (HBsAg) y al anticuerpo del virus de la hepatitis C (HCB). De todos modos, los derivados de sangre humana y las muestras del paciente han de considerarse potencialmente infecciosos. Respétense las buenas prácticas de laboratorio para la conservación, dispensación y eliminación de estos materiales<sup>6</sup>.

**ADVERTENCIA:** la azida de sodio ( $\text{NaN}_3$ ) puede reaccionar con el plomo y el cobre de las tuberías, dando origen a azidas metálicas altamente explosivas. Después de utilizar los líquidos, lave con abundante agua para impedir la acumulación de azida. La azida de sodio es tóxica por ingestión. En caso de ingestión accidental, informe de inmediato al director del laboratorio o acuda a un centro de control de envenenamientos.

**Para asegurar resultados válidos, es menester seguir las instrucciones exactamente como se presentan en este prospecto.** No mezcle los componentes del kit con componentes de otro origen o que no tengan el mismo número de catálogo de Immco Diagnostics Inc.

Respete las buenas técnicas de laboratorio para reducir al mínimo la contaminación microbiana y química. No utilice el producto después de la fecha de caducidad.

### Material suministrado

ELISA para anticuerpos TPO ImmuLisa™ **REF** 1132

Los reactivos del kit son suficientes para efectuar 96 análisis.








12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>TPO</b>	<b>Microplaca</b> con micropocillos individuales separables recubiertos con antígeno TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador A</b> listo para usar ( <i>tapa verde</i> ). Suero humano con anticuerpos anti TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador B</b> listo para usar ( <i>tapa morada</i> ). Suero humano con anticuerpos anti TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador C</b> listo para usar ( <i>tapa azul</i> ). Suero humano con anticuerpos anti TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador D</b> listo para usar ( <i>tapa amarilla</i> ). Suero humano con anticuerpos anti TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>TPO</b> *	<b>Control positivo</b> listo para usar ( <i>tapa roja</i> ). Contiene suero humano positivo a anticuerpos TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Control negativo</b> listo para usar ( <i>tapa blanca</i> ). Contiene suero humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti humano con fosfatasa alcalina</b> listo para usar. Color rosado.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de suero</b> listo para usar. Color azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> listo para usar. Contiene pNPP. <b>Protéjase de la luz.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solución Stop</b> lista para usar.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampón de lavado en polvo.</b> Reconstituir cada unidad hasta un litro.

\* Contiene <0.1%  $\text{NaN}_3$

### Símbolos utilizados en las etiquetas:

**LOT** Número de lote

ES

-  REF Número de catálogo
-  Fecha de caducidad
-  Temperatura de conservación
-  Léanse las instrucciones de uso
-  IVD Para diagnóstico *in vitro*
-  Fabricante
-  Número de análisis

### **Materiales necesarios no suministrados**

- Agua desionizada o destilada
- Botella dispensadora para el tampón de lavado diluido
- Pipetas con capacidad de 5 µl a 1000 µl
- Puntas de pipetas desechables
- Tubos de ensayo limpios 12 x 75 mm y gradilla de ensayo
- Temporizador
- Papel absorbente
- Lector de microplaca para lectura de valores de absorbancia a 405 nm. Si se dispone de un lector de doble longitud de onda, el filtro de referencia debe regularse en 600-650 nm.
- Lavador automático de placas con capacidad de 200 µl

### **RECOGIDA Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS**

Para este procedimiento se han de utilizar únicamente muestras de suero. No se deben utilizar muestras muy hemolizadas, lipémicas o contaminadas por microbios porque interferirían en el desarrollo del ensayo. Conserve las muestras a 2°- 8°c no más de una semana. Si se han de conservar por más tiempo, es necesario congelarlas. Evite congelar y descongelar repetidamente las muestras.

### **PROCEDIMIENTO**

#### **Advertencias preliminares**

- Lea detenidamente estas instrucciones antes de comenzar el análisis.
- Deje que los reactivos y las muestras se estabilicen a temperatura ambiente antes de dar comienzo a la prueba. Vuelva a poner de inmediato en la nevera los materiales y muestras no utilizados.
- Prepare todas las diluciones de las muestras del paciente antes de comenzar el análisis.
- Una buena técnica de lavado es crucial. Si efectúa el lavado manualmente, rocíe toda la microplaca con un fuerte chorro de solución de lavado, utilizando una botella de boca ancha. **Se recomienda el uso de un lavador automático de microplacas.**
- Use una pipeta multicanal que pueda servir simultáneamente 8 pocillos; de este modo se agiliza el proceso y el tiempo de incubación es más uniforme.
- Es importante controlar bien el tiempo. El período de incubación empieza después de dispensar los reactivos.
- Las muestras y reactivos deben añadirse a la misma velocidad y en la misma secuencia.
- Saque las tiras de pocillos de su sobre y ciérrelo cuidadosamente para evitar condensación en los pocillos no utilizados. Vuelva a ponerlo de inmediato en la nevera.

### Procedimiento del ensayo

- Paso 1** Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de dar comienzo al ensayo.
- Paso 2** Señale en la hoja de protocolo la colocación de la muestra en la microplaca. Es buena práctica de laboratorio analizar las muestras por duplicado.
- Paso 3** **Determinación cualitativa:** use únicamente el Low Calibrator D (*frasco de tapa amarilla*) listo para usar. **Determinación semicuantitativa:** use los calibradores listos para usar de A a D como se muestra en el ejemplo siguiente:

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA

A	BLANK	S5	○	○
B	NEG	S6	○	○
C	POS	S7	○	○
D	CAL D	S8	○	○
E	S1	S9	○	○
F	S2	S10	○	○
G	S3	S11	○	○
H	S4	S12	○	○
	1	2	3	4

DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

A	BLANK	S2	○	○
B	NEG	S3	○	○
C	POS	S4	○	○
D	CAL A	S5	○	○
E	CAL B	S6	○	○
F	CAL C	S7	○	○
G	CAL D	S8	○	○
H	S1	S9	○	○
	1	2	3	4

- Paso 4** Prepare una dilución de **1:201** de la muestra del paciente, mezclando **5 µl** de la muestra del paciente con **1.0 ml** de diluyente de suero.
- Paso 5** Coja los pocillos necesarios del sobre; guarde las tiras no utilizadas en el sobre hermético y póngalo en la nevera. Coloque los pocillos en el soporte suplementario.
- Paso 6** Pipetee **100 µl** de calibrador listo para usar, de controles positivo y negativo y muestras diluidas del paciente en los correspondientes pocillos, como se indica en la hoja de protocolo.  
**Nota:** Incluya un pocillo con **100 µl** de diluyente de suero como blanco de reactivo. Ponga el lector ELISA en cero con respecto al blanco de reactivo.
- Paso 7** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 8** Lave **4 veces** con el tampón de lavado. Para lavado manual, llene cada pocillo con el tampón de lavado reconstituido. Elimine el líquido invirtiendo y sacudiendo el pocillo, o bien aspire el líquido de cada pocillo. Al terminar el último lavado, invierta las tiras y sacúdalas enérgicamente sobre papel absorbente. Si utiliza un lavador automático, programe el ciclo de lavado siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Paso 9** Pipetee **100 µl** de conjugado en los pocillos.
- Paso 10** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 11** Lave los pocillos repitiendo el paso 8.
- Paso 12** Pipetee **100 µl** de substrato enzimático en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos del conjugado.
- Paso 13** Incube **30 minutos** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Paso 14** Pipetee **100 µl** de solución Stop en cada pocillo, en la misma secuencia y tiempos en que añadió el substrato enzimático. Lea la absorbancia en el plazo de una hora después de haber añadido la solución Stop.
- Paso 15** Lea la absorbancia de cada pocillo a **405 nm** mediante un lector de microplacas de longitud de onda simple o doble 405/630nm, comparándola con el blanco de reactivo regulado en absorbancia cero.

### Control de Calidad

En cada ensayo es necesario procesar calibradores, controles positivo y negativo y un blanco de reactivo para comprobar la integridad y precisión del análisis. La lectura de absorbancia del blanco de reactivo deberá ser <0,3. La lectura de absorbancia del calibrador A no debe ser inferior a 1,0, de lo contrario será necesario repetir el análisis. El control negativo debe ser <20 IU/ml. Si el análisis se efectúa por duplicado, se tomará la media de las dos lecturas para determinar las IU/ml. Si se efectúan determinaciones cualitativas, la densidad óptica del calibrador D debe ser superior a la del control negativo e inferior a la absorbancia del control positivo. En las determinaciones semicuantitativas, los valores del control positivo deben estar dentro de los límites establecidos en el vial.

### RESULTADOS

#### Cálculo

Las concentraciones en la muestra del paciente se pueden determinar mediante dos métodos:

#### 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA

Abs. de muestra analizada

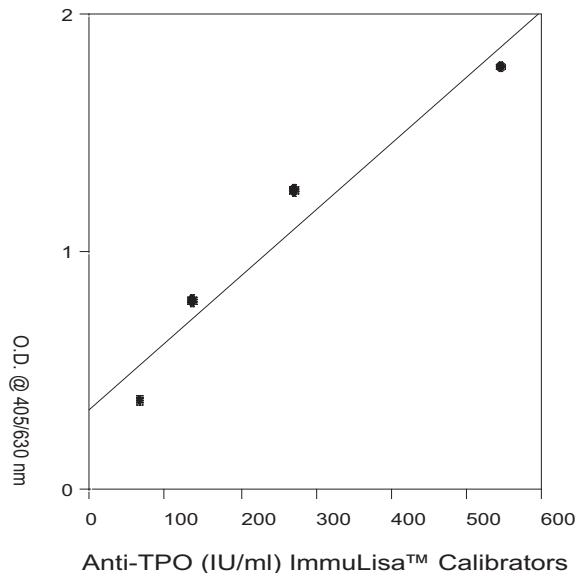
$$\frac{\text{Abs. de muestra analizada}}{\text{Abs. de Calibrador D}} \times \text{IU/ml de Calibrador D} = \text{IU/ml muestra analizada}$$

Abs. de Calibrador D

#### 2. DETERMINACIÓN SEMI CUANTITATIVA

Registre la absorbancia de los Calibradores A a D en relación a sus respectivas concentraciones en una hoja de papel milimetrado. Registre la concentración en IU/ml en el eje X en relación a la absorbancia en el eje Y y trace la curva que mejor se adapte. Determine las concentraciones de la muestra del paciente según la curva comparándola con su correspondiente valor de absorbancia.

Anti-TPO (IU/ml) Immulisa™ Standard Curve



### Calibradores

Los calibradores listos para usar proveen la semi cuantificación y deben utilizarse en cada ensayo. Las muestras de pacientes que contengan niveles altos de anticuerpos podrían dar valores de absorbancia superiores a los del calibrador A. Para determinar con precisión los valores semi cuantitativos, las muestras con esas características deben volverse a diluir, de modo que queden dentro de los límites de la curva del calibrador al ser analizadas nuevamente. Para determinar las IU/ml, multiplique las unidades obtenidas por el factor de dilución.

**Interpretación**

La información siguiente se da únicamente a título de guía para la interpretación de los resultados de laboratorio. Los valores que se indican se obtuvieron analizando muestras de 80 donantes de sangre normales, y representan la media de esas muestras más 2 DS. Cada laboratorio establecerá sus propios valores normales.

Valores Anti-TPO	Interpretación
≤20 IU/ml	Negativo
>20 IU/ml	Positivo

**LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO**

Los anticuerpos tiroideos pueden estar presentes también en trastornos no tiroideos. Los resultados de este análisis no constituyen por sí solos un diagnóstico de enfermedad tiroidea; deben ser considerados en conjunto con la prueba de captación de yodo y otros estudios estándar del tiroides, además del examen clínico del paciente.

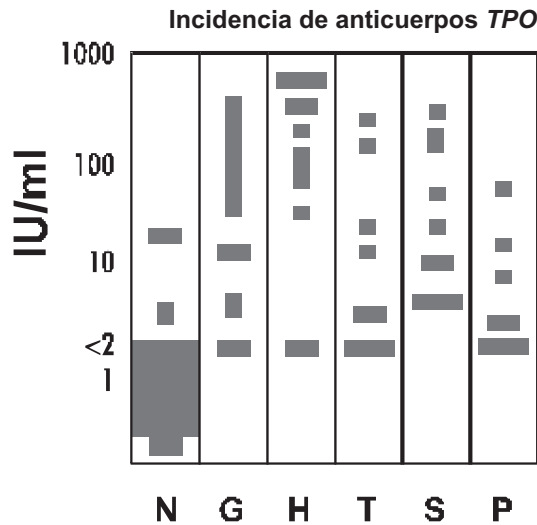
**VALORES ESPERADOS**

Si bien los valores esperados en una población normal son negativos, un 5-10% de individuos aparentemente sanos y asintomáticos puede resultar positivo al análisis de autoanticuerpos de tiroides. La incidencia de estos autoanticuerpos aumenta al avanzar la edad.

Los datos que siguen ilustran la incidencia de autoanticuerpos tiroideos en individuos normales y en diferentes estados patológicos, determinados utilizando las placas ImmuLISA™. Los anticuerpos anti TPO se presentan principalmente en las enfermedades de *Grave* y de *Hashimoto*, en el *bocio nodular tóxico* y asociados con otros trastornos autoinmunes como el *LES*.

**Importancia de los anticuerpos tiroideos**

Especificidad Ab	Asociación con la enfermedad	Indicaciones
<b>Tiroglobulina (Tg)</b>	1) enfermedades autoinmunes del tiroides 2) Niveles incorrectos de tiroglobulina	complementar los niveles de tiroglobulina
<b>Microsomal (TPO)</b>	Enfermedad autoinmune del tiroides	1) Bocio de etiología desconocida 2) Hipertiroidismo



N = normales (99) G = Enfermedad de Grave (25) H = Enfermedad de Hashimoto (15) T = Bocio multinodular tóxico (11) S = LES (20) P = Cirrosis biliar primaria (9)

**CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO**

Los resultados obtenidos con el ensayo ELISA para anticuerpos anti TPO ImmuLisa™ se compararon con otro ensayo disponible en comercio.

		ImmuLisa™		Total
		Positivo	Negativo	
Otro ELISA	Positivo	42	14	56
	Negativo	4	62	66
	Total	46	76	122

Correspondencia relativa: 85.2%

Sensibilidad relativa: 75%

Especificidad relativa: 94%

**Precisión:**

Basándose en 10 repeticiones, el coeficiente de variación intraensayo e interensayo se determinó analizando tres diferentes sueros positivos a anticuerpos anti TPO con ELISA para anti-TPO ImmuLisa™. Los resultados fueron los siguientes:

	valor medio	interensayo	intraensayo
	IU/ml	%CV	%CV
Muestra 1	196,6	10,8	6,6
Muestra 2	155,8	12,3	8,0
Muestra 3	110,9	18,0	7,5

**Recuperación:**

Muestras con concentraciones conocidas de anticuerpos anti-TPO se mezclaron con diluciones apropiadas de otra muestra positiva con cantidades conocidas. Se determinaron los niveles de anticuerpos anti-TPO de las muestras mezcladas y a partir de los valores obtenidos se calculó el porcentaje de recuperación. Los resultados fueron los siguientes:

	Conc. Ab TPO añadida (IU/ml)	Conc. Ab TPO obtenida (IU/ml)	% Recuperación
Muestra 1	275,0	244,3	88,9
Muestra 2	183,0	175,3	95,8
Muestra 3	116,0	107,0	92,2



## Anti-Schilddrüsenperoxidase-Antikörper-ELISA (TPO)

IVD

### BEIPACKTEXT

REF 1132 TPO-Antikörper-ELISA 96 Bestimmungen

### VERWENDUNGSZWECK

Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (ELISA) für den qualitativen Nachweis und die semi-quantitative Bestimmung von Autoantikörpern gegen TPO in Humanserum als Hilfsmittel bei der Diagnose bestimmter Schilddrüsenkrankheiten - *Hashimoto-Thyreoiditis*, *Graves-Krankheit* und nichttoxische Struma.

### ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG

Das klinische Spektrum von autoimmunen Schilddrüsenkrankheiten ist sehr breit, und die Schilddrüse der betroffenen Patienten kann überfunktionieren, unterfunktionieren oder sogar normal funktionieren. Es gibt zwei Hauptformen von autoimmunen Schilddrüsenkrankheiten, *Graves-Krankheit* und *Hashimoto-Thyreoiditis*. Autoimmune Schilddrüsenreaktionen können auch bei anderen Schilddrüsenstörungen auftreten, z.B. bei sporadischer und endemischer Struma, Plummer-Krankheit und endokriner Ophthalmopathie<sup>1-5</sup>.

Bei Patienten mit diesen Krankheiten sind häufig Autoantikörper gegen Thyreoglobulin- und Schilddrüsenperoxidase-(TPO)-Antigene vorhanden. Thyreoglobulin (Tg) ist ein homodimerisches Glykoprotein von 660 kD, das als Schilddrüsenprohormon fungiert. TPO ist ein membrangebundenes Enzym von 105 kD, das die Biosynthese des Schilddrüsenhormons katalysiert. Durch die TPO-katalysierte Jodination und Koppelung an spezifischen hormonogenen Tyrosinen werden Thyroxin und Trijodthyronin gebildet. Die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin und TPO ist für die Diagnose von autoimmunen Schilddrüsenkrankheiten von Bedeutung. Diese Antikörper können mit verschiedenen Methoden bestimmt werden, darunter indirekte Immunfluoreszenz, passive Hämagglutination und ELISA.

### TESTPRINZIP

Der ELISA wird als Festphasenimmuntest durchgeführt. Mikrotiterplattenvertiefungen werden mit nativem TPO-Antigen beschichtet, und die unreaktierten Stellen werden blockiert, um die nicht-spezifische Bindung zu reduzieren. Kontrollseren, Kalibratoren und Serumproben von Patienten werden in den antigenbeschichteten Vertiefungen inkubiert; dies ermöglicht die Bindung der im Serum vorhandenen spezifischen Antikörper an das TPO-Antigen. Nicht-gebundene Antikörper und andere Serumeiweiße werden durch Waschen der Mikrotitervertiefungen entfernt. Gebundene Antikörper werden durch Zugabe eines enzymmarkierten Anti-human-IgG-Konjugats in die Vertiefungen nachgewiesen. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt. Anschließend wird ein spezifisches Enzymsubstrat (pNPP) in die Vertiefungen gegeben. Das Vorhandensein von Antikörpern wird mittels einer Farbveränderung festgestellt, die durch die Umwandlung des pNPP-Substrats in ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht. Die Reaktion wird gestoppt, und die Intensität der Farbveränderung, welche proportional zur Konzentration der Antikörper ist, wird bei 405 nm mit einem Spektrophotometer gemessen. Die Ergebnisse werden in Internationalen Einheiten pro Milliliter (IU/ml) angegeben.

### REAGENZEN

#### Lagerung und Zubereitung

Alle Reagenzien bei 2-8 °C lagern. **Nicht einfrieren.**

Verwenden Sie das Reagenz nicht, falls es trüb ist oder Partikel enthält. Alle Reagenzien müssen vor der Anwendung auf Raumtemperatur (20-25 °C) gebracht werden.

Bei Lagerung bei 2-8 °C ist der rekonstituierte Waschpuffer bis zum Verfallsdatum des Kits haltbar. Rekonstituieren Sie den Waschpuffer auf 1 Liter mit destilliertem oder entionisiertem Wasser.

Die beschichteten Mikrotitervertiefungsstreifen sind nur zur einmaligen Anwendung bestimmt.

### Vorsichtsmaßnahmen

In-vitro-Diagnostikum. Alle Bestandteile menschlicher Herkunft wurden mit von der FDA vorgeschriebenen Tests auf HbsAg, HCV, HIV-1 und -2 und HTLV-I getestet und für negativ befunden. Auf menschlichem Blut basierende Produkte sowie Patientenproben sollten jedoch als potentiell infektiös angesehen werden. Befolgen Sie bei der Lagerung, Verteilung und Entsorgung dieser Materialien die Regeln der Guten Laborpraxis<sup>6</sup>.

WARNUNG – Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) kann mit Blei- und Kupferrohren reagieren und dabei hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie bei der Entsorgung von Flüssigkeiten mit reichlich Wasser nach, um eine Anhäufung von Azid zu vermeiden. Natriumazid kann giftig sein, wenn es verschluckt wird. Bei Verschlucken muss sofort der Laborleiter oder die Vergiftungszentrale informiert werden.

**Die Anweisungen sollten genau wie in diesem Beipacktext dargestellt befolgt werden, um gültige Ergebnisse sicherzustellen.** Tauschen Sie Kitbestandteile nicht gegen Produkte aus anderen Quellen aus, sondern nur gegen Produkte von Immco Diagnostics Inc. mit derselben Bestellnummer. Befolgen Sie die Gute Laborpraxis, um beim Umgang mit Reagenzien mikrobielle Verunreinigungen und Verschleppungen so gering wie möglich zu halten. Nicht nach dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.

### Mitgelieferte Materialien

ImmuLisa™ TPO-Antikörper-ELISA REF 1132

Die Kits enthalten ausreichend Reagenzien zur Durchführung von jeweils 96 Bestimmungen.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>TPO</b>	<b>Mikrotiterplatte</b> mit einzeln abbrechbaren Mikrotitervertiefungen, mit TPO-Antigen beschichtet
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>TPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator A</b> ( <i>grüne Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>TPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator B</b> ( <i>lila Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>TPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator C</b> ( <i>blaue Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>TPO</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Kalibrator D</b> ( <i>gelbe Kappe</i> ). Humanserum mit Antikörpern gegen TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>TPO</b> *	Gebrauchsfertiges <b>positives Kontrollserum</b> ( <i>rote Kappe</i> ). Enthält TPO-Antikörper-positives Humanserum.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	Gebrauchsfertiges <b>negatives Kontrollserum</b> ( <i>weiße Kappe</i> ). Enthält Humanserum.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Anti-human-alk.-Phos.-Konjugat</b> . Farbkennzeichnung rosa.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	Gebrauchsfertiger <b>Serumverdünner</b> . Farbkennzeichnung blau.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	Gebrauchsfertiges <b>Enzymsubstrat</b> . Enthält pNPP. <b>Vor Licht schützen.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	Gebrauchsfertige <b>Stopplösung</b> .
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Waschpuffer in Pulverform</b> . Auf jeweils einen Liter rekonstituieren.


\* Enthält <0,1%  $\text{NaN}_3$

### Auf den Etiketten verwendete Symbole:


 Chargennummer

 Bestellnummer

 Verwendbar bis

 Lagerungstemperatur

 Gebrauchsanleitung lesen

 In-vitro-Diagnostikum

 Hersteller

 Anzahl an Tests

### Benötigte, nicht mitgelieferte Materialien

- Entionisiertes oder destilliertes Wasser
- Spritzflasche für den verdünnten Waschpuffer
- Pipetten mit einem Volumenbereich von 5 µl bis 1000 µl
- Pipettenspitzen zur einmaligen Verwendung
- Saubere Probenröhrchen 12 x 75 mm und Röhrchenhalter
- Stoppuhr
- Saugfähige Papiertücher
- Mikrotiterplattenreader, der Extinktionswerte bei 405 nm ablesen kann. Falls ein Mikrotiterplattenreader mit doppelter Wellenlänge verwendet wird, sollte der Referenzfilter auf 600-650 nm eingestellt werden.
- Automatischer Mikrotiterplattenwascher mit einer Verteilungskapazität von 200 µl

### PROBENENTNAHME UND -HANDHABUNG

Für dieses Verfahren sollten nur Serumproben verwendet werden. Stark hämolysierte, lipämische oder mikrobiell verunreinigte Proben können die Leistung des Tests beeinflussen und sollten nicht verwendet werden. Lagern Sie die Proben höchstens eine Woche lang bei 2-8 °C. Zur längeren Aufbewahrung sollten Serumproben eingefroren werden. Vermeiden Sie ein wiederholtes Einfrieren und Auftauen der Proben.

### VERFAHREN

#### Hinweise zum Verfahren

- Lesen Sie sorgfältig den Beipacktext, bevor Sie mit dem Test beginnen.
- Warten Sie vor Beginn des Testverfahrens, bis die Serumproben und Testreagenzien Raumtemperatur erreicht haben. Stellen Sie alle nicht verwendeten Proben und Reagenzien sofort nach der Anwendung wieder in den Kühlschrank.
- Alle Verdünnungen der Patientenproben sollten vor Beginn des Tests vorbereitet werden.
- Eine gute Waschmethode ist unerlässlich. Wenn von Hand gewaschen wird, erreichen Sie eine angemessene Spülung, indem Sie eine Waschflasche mit einer breiten Düse verwenden und einen starken Strahl Waschpuffer über die gesamte Mikrotiterplatte spritzen. **Die Anwendung eines automatischen Mikrotiterplattenwaschers wird empfohlen.**
- Verwenden Sie eine Multikanalpipette, die gleichzeitig in 8 Vertiefungen pipettieren kann. Dies beschleunigt das Verfahren und resultiert in gleichmäßigeren Inkubationszeiten.
- Für alle Schritte ist eine sorgfältige Kontrolle der zeitlichen Koordinierung wichtig. Alle Inkubationszeiträume beginnen, sobald das Zufügen der Reagenzien abgeschlossen ist.

DE

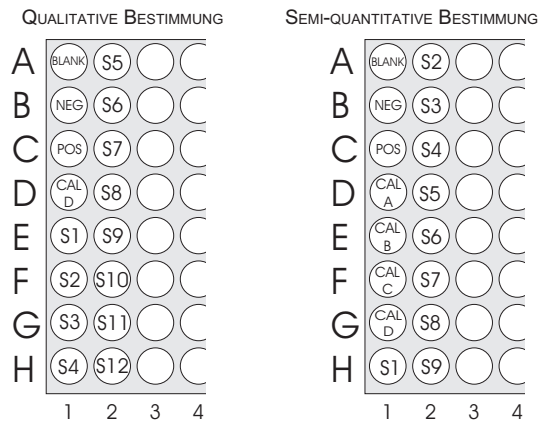
- Das Zufügen aller Proben und Reagenzien sollte mit derselben Geschwindigkeit und in derselben Reihenfolge erfolgen.
- Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl an Mikrotitervertiefungstreifen; verschließen Sie dann den Beutel sorgfältig, um Kondensation in den nicht verwendeten Vertiefungen zu vermeiden. Legen Sie den Beutel sofort wieder in den Kühlschrank.

### Testmethode

**Schritt 1** Lassen Sie alle Reagenzien und Proben Raumtemperatur erreichen.

**Schritt 2** Verwenden Sie den Protokollbogen, um die Positionen der Proben in den Vertiefungen zu notieren. Es entspricht der Guten Laborpraxis, Proben zweifach zu testen.

**Schritt 3** Verwenden Sie für eine **qualitative Bestimmung** nur den gebrauchsfertigen niedrigen Kalibrator D (*Fläschchen mit gelber Kappe*).  
**oder** Verwenden Sie für eine **semi-quantitative Bestimmung** die gebrauchsfertigen Kalibratoren A bis D, wie in der Probenanordnung unten angezeigt.



**Schritt 4** Verdünnen Sie die Patientenproben im Verhältnis **1:201**, indem Sie **5 µl** des Patientenserums mit **1,0 ml** Probenverdünner vermischen.

**Schritt 5** Entnehmen Sie dem Beutel die benötigte Anzahl Vertiefungen und legen Sie die nicht verwendeten Streifen im versiegelten Beutel wieder in den Kühlschrank. Setzen Sie die Vertiefungen sicher in den mitgelieferten Halter ein.

**Schritt 6** Pipettieren Sie **100 µl** der gebrauchsfertigen Kalibratoren, der positiven und negativen Kontrollseren und der verdünnten Patientenproben in die auf dem Protokollbogen angezeigten entsprechenden Vertiefungen.

**Anmerkung:** Geben Sie in eine Vertiefung **100 µl** Serumverdünner als Blindprobe. Stellen Sie den ELISA-Reader gegen diese Blindprobe auf Null.

**Schritt 7** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 8** Waschen Sie **viermal** mit Waschpuffer. Wenn Sie manuell waschen, füllen Sie jede Vertiefung mit rekonstituiertem Waschpuffer. Entfernen Sie die Flüssigkeit, indem Sie jede Vertiefung umdrehen und deren Inhalt ausklopfen, oder indem Sie die Flüssigkeit aus jeder Vertiefung absaugen. Drehen Sie zum Trocknen am Ende des letzten Waschens die Streifen um und klopfen Sie über saugfähigem Papier kräftig auf die Vertiefungen. Wenn Sie einen automatischen Wascher verwenden, programmieren Sie diesen entsprechend den Anweisungen des Herstellers.

**Schritt 9** Pipettieren Sie **100 µl** Konjugat in die Vertiefungen.

**Schritt 10** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 11** Waschen Sie alle Vertiefungen wie in Schritt 8 beschrieben.

**Schritt 12** Pipettieren Sie **100 µl** Enzymsubstrat in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Konjugat.

DE

**Schritt 13** Inkubieren Sie **30 Minuten** ( $\pm$  5 Minuten) lang bei Raumtemperatur.

**Schritt 14** Pipettieren Sie **100  $\mu$ l** Stopplösung in jede Vertiefung; gehen Sie dabei in derselben Reihenfolge und mit derselben Geschwindigkeit vor wie beim Hinzufügen des Enzymsubstrats. Lesen Sie den Extinktionswert innerhalb 1 Stunde nach Hinzufügen der Stopplösung ab.

**Schritt 15** Lesen Sie die Extinktion jeder Vertiefung bei **405 nm** gegen die Blindprobe, für die der Extinktionswert Null eingestellt wurde, ab; verwenden Sie einen Mikrotiterplattenreader mit einer einzigen Wellenlänge oder mit einer doppelten Wellenlänge von 405/630 nm.

### Qualitätskontrolle

Bei jedem Testlauf müssen Kalibratoren, positive und negative Kontrollseren und eine Blindprobe mitgetestet werden, um die Unverfälschtheit und Genauigkeit des Tests zu überprüfen. Der Extinktionswert der Blindprobe sollte  $<0,3$  sein. Kalibrator A sollte einen Extinktionswert von mindestens 1,0 haben, anderenfalls muss der Test wiederholt werden. Der Wert des negativen Kontrollserums muss  $<20$  IU/ml sein. Falls der Test doppelt durchgeführt wurde, sollte der Mittelwert der beiden Messungen verwendet werden, um die IU/ml zu bestimmen. Bei der Durchführung von qualitativen Bestimmungen muss die Extinktion von Kalibrator D größer als die des negativen Kontrollserums und kleiner als die Extinktion des positiven Kontrollserums sein. Für semi-quantitative Bestimmungen müssen die Werte des positiven Kontrollserums innerhalb des auf dem Fläschchen angegebenen Bereichs liegen.

## ERGEBNISSE

### Berechnungen

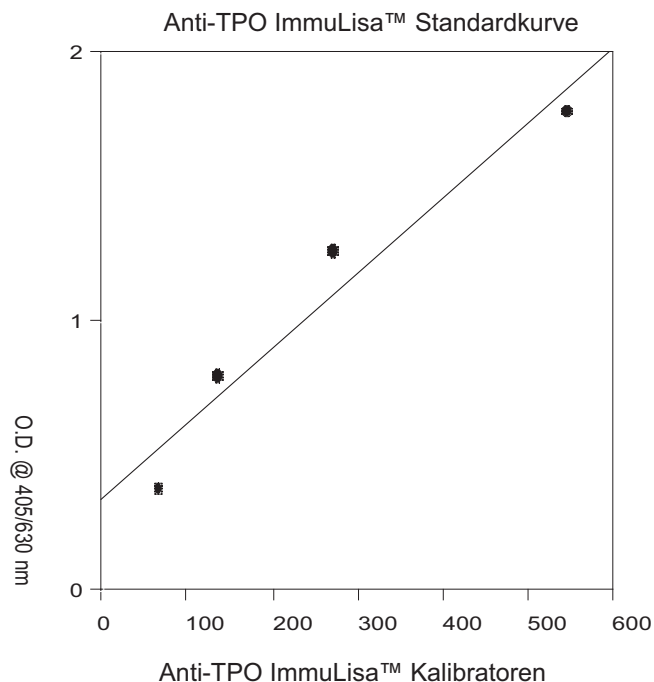
Die Konzentrationen der Patientenproben können mit einer der beiden folgenden Methoden bestimmt werden:

#### 1. QUALITATIVE BESTIMMUNG

$$\frac{\text{Ext. der Testprobe}}{\text{Ext. von Kalibrator D}} \times \text{IU/ml von Kalibrator D} = \text{IU/ml der Testprobe}$$

#### 2. SEMI-QUANTITATIVE BESTIMMUNG

Tragen Sie auf kariertem Millimeterpapier die Extinktionen der Kalibratoren A bis D gegen ihre jeweilige Konzentration auf. Tragen Sie die Konzentration in IU/ml auf der X-Achse gegen die Extinktion auf der Y-Achse auf und zeichnen Sie die passendste Kurve. Bestimmen Sie auf der Kurve die Konzentrationen der Patientenproben gegen ihre entsprechenden Extinktionswerte.



### Kalibrator

Die gebrauchsfertigen Kalibratoren sind im Kit enthalten, um die semi-quantitative Bestimmung zu ermöglichen; sie müssen bei jedem Testlauf verwendet werden. Patientenproben mit hohen Antikörperspiegeln können höhere Extinktionswerte aufweisen als Kalibrator A. Um genaue semi-quantitative Werte bestimmen zu können, sollten solche Proben nochmals verdünnt werden, damit sie bei einem erneuten Test innerhalb des Bereichs der Kalibratorkurve fallen. Um die IU/ml zu bestimmen, müssen Sie den erhaltenen Wert mit dem Verdünnungsfaktor multiplizieren.

### Interpretation

Die folgenden Angaben dienen nur als Leitfaden bei der Interpretation der Laborergebnisse. Diese Werte wurden bestimmt, indem 80 normale Blutspender getestet wurden. Die unten angezeigten Werte sind der Mittelwerte der normalen Testpersonen plus 2 Standardabweichungen. Jedes Labor muss seine eigenen Normalwerte festlegen.

#### Anti-TPO-Werte Interpretation

≤20 IU/ml	Negativ
>20 IU/ml	Positiv

### EINSCHRÄNKUNGEN DES VERFAHRENS

Schilddrüsenautoantikörper können auch bei anderen als Schilddrüsenkrankheiten vorhanden sein. Die mit diesem Test erhaltenen Ergebnisse sind nicht allein diagnostisch für Schilddrüsenkrankheiten. Sie sollten im Zusammenhang mit Jodaufnahme und anderen standardmäßigen Schilddrüsentests sowie dem klinischen Zustand des Patienten bewertet werden.

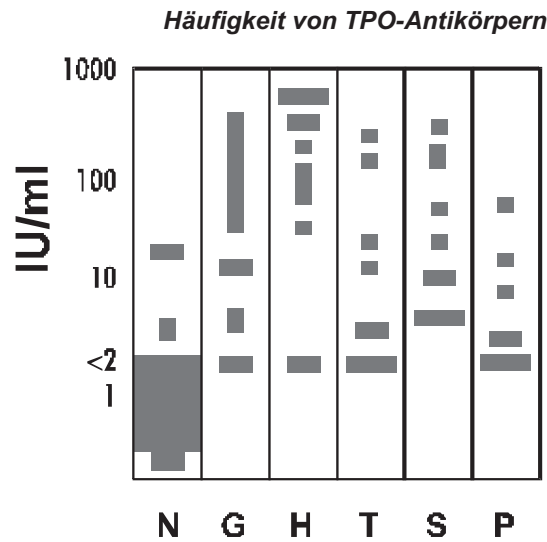
### ERWARTETE WERTE

Die erwarteten Werte in einer normalen Population sind negativ. Tests auf Schilddrüsenautoantikörper können jedoch bei 5-10% von anscheinend gesunden, asymptomatischen Personen positiv ausfallen. Die Häufigkeit dieser Autoantikörper erhöht sich mit dem Alter.

Die nachstehende Tabelle und Abbildung zeigen die mit ImmuLisa™ Antigenplatten bestimmte Häufigkeit von Schilddrüsenautoantikörpern bei normalen Testpersonen und bei verschiedenen Krankheitsbildern. Anti-TPO-Antikörper treten hauptsächlich bei *Graves-Krankheit*, *Hashimoto-Thyreoiditis*, toxischer Struma nodosa und im Zusammenhang mit anderen Autoimmunkrankheiten, z.B. SLE, auf.

#### Relevanz von Schilddrüsenantikörpern

AK-Spezifität	Krankheitszusammenhang	Anwendungsindikationen
<b>Thyroglobulin (Tg)</b>	1) autoimmune Schilddrüsenkrankheiten 2) fehlerhafte Thyroglobulinspiegel	zusätzlich zum Thyroglobulinspiegel
<b>Mikrosomal (TPO)</b>	autoimmune Schilddrüsenkrankheit	1) Struma unbekannter Ursache 2) Schilddrüsenüberfunktion



*N=normale Personen (99), G=Graves-Krankheit (25),  
H=Hashimoto-Thyreoiditis (15), T=toxische Struma  
multinodosa (11), S=SLE (20), P=primäre biliäre Zirrhose (9)*

#### LEISTUNGSMERKMALE

Die mit dem ImmuLisa™ Anti-TPO-ELISA erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen eines anderen für den Handel hergestellten Tests verglichen.

		ImmuLisa™		Gesamt
		Positiv	Negativ	
anderer ELISA	Positiv	42	14	56
	Negativ	4	62	66
	Gesamt	46	76	122

Relative Übereinstimmung: 85.2%

Relative Sensitivität: 75%

Relative Spezifität: 94%

#### Genauigkeit:

Drei verschiedene Anti-TPO-Antikörper-positive Seren wurden mit dem ImmuLisa™ Anti-TPO-ELISA getestet, um auf der Grundlage von 10 Wiederholungen den interseriellen und intraseriellen Variationskoeffizienten zu bestimmen. Die Ergebnisse sind untenstehend angezeigt:

	Mittelwert	interserieller	intraserieller
	IU/ml	VK %	VK %
<b>Probe 1</b>	196,6	10,8	6,6
<b>Probe 2</b>	155,8	12,3	8,0
<b>Probe 3</b>	110,9	18,0	7,5

DE

**Wiederfindung:**

Proben mit bekannten Anti-TPO-Antikörper-Konzentrationen wurden mit geeigneten Verdünnungen einer anderen positiven Probe mit bekannten Mengen gemischt. Die Anti-TPO-Antikörperspiegel der gemischten Proben wurden bestimmt und die Wiederfindung in Prozent wurde aus den erhaltenen Werten errechnet. Folgende Ergebnisse wurden erhalten:

	<b>TPO-AK-Kpnz. zugefügt (IU/ml)</b>	<b>TPO-AK-Kpnz. zugefügt (IU/ml)</b>	<b>% Wiederfindung</b>
<b>Probe 1</b>	275,0	244,3	88,9
<b>Probe 2</b>	183,0	175,3	95,8
<b>Probe 3</b>	116,0	107,0	92,2



# Anticorps anti-peroxydase thyroïdienne (TPO) ELISA

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 1132 Anticorps TPO ELISA 96 Tests

### USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, destinée à la détection qualitative et à la quantification des auto-anticorps contre la peroxydase thyroïdienne TPO dans le sérum humain. Rôle : fournir un support dans le diagnostic de certaines désordres thyroïdiens – *thyroïdite d'Hashimoto, maladie de Graves* et goitre non-toxique.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le spectre clinique des désordres thyroïdiens autoimmuns est large et le patient affecté peut être soit de type hyper, hypo ou même euthyroïdien. Il existe deux formes principales de troubles thyroïdiens autoimmuns, la maladie de Graves-Basedow et la thyroïdite de Hashimoto. Des réactions thyroïdiennes autoimmunes peuvent également se manifester dans d'autres anomalies thyroïdiennes telles que le goitre sporadique et endémique, la maladie de Plummer et l'ophtalmopathie endocrine.

Les patients qui présentent de telles maladies manifestent une association avec la présence d'auto-anticorps aux antigènes de la peroxydase thyroïdienne (TPO) et de la thyroglobuline. La thyroglobuline (Tg) est une glycoprotéine homodimérique 660 kD qui fonctionne comme une prohormone thyroïdienne. La TPO est une enzyme liée à la membrane de 105 kD qui catalyse la biosynthèse de l'hormone thyroïdienne. La thyroxine et la triiodothyronine sont engendrées par l'iodation catalysée par thyroperoxydase (TPO) et par l'accouplement de tyrosines homogéniques spécifiques. La mesure des auto-anticorps à la thyroglobuline et à la TPO est importante pour le diagnostic de maladies thyroïdiennes autoimmunes. Ces anticorps peuvent être mesurés par différentes méthodes telles que l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et la méthode ELISA.

### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test ELISA est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide. Des microplaques à puits sont enduites avec des antigènes natifs TPO, suivi d'un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les régulateurs, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner avec l'antigène TPO. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques.

Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux micropuits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage.

La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat du pNPP vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps, est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales par millilitre (IU/ml).

### RÉACTIFS

#### Stockage et préparation

Conserver tous les réactifs à 2° - 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage.

Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration du

kit. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.

### Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro*, tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>6</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

**Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables.** Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources, si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'Immco Diagnostics Inc. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

### Matériel fourni









Immula™ Anticorps TPO ELISA **REF** 1132

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	<b>MICROPLATE TPO</b>	<b>Microplaques</b> avec micropuits individuels séparables enduits avec de l'antigène TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A TPO</b> *	<b>Calibreur A</b> ( <i>couvercle vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B TPO</b> *	<b>Calibreur B</b> ( <i>couvercle violet</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C TPO</b> *	<b>Calibreur C</b> ( <i>couvercle bleu</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D TPO</b> *	<b>Calibreur D</b> ( <i>couvercle jaune</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + TPO</b> *	<b>Régulateur positif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle rouge</i> ). Contient du sérum humain positif pour les anticorps anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Régulateur négatif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle blanc</i> ). Contient du sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué anti-IgG</b> humain prêt à l'emploi. Codé en couleur rose.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant de sérum</b> prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat d'enzyme</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Conserver à l'abri de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF WASH</b>	Poudre <b>Wash Buffer</b> (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun.

\* Contient <0.1% NaN<sub>3</sub>

**Symboles utilisés sur les étiquettes:**

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

**Matériel nécessaire mais non fourni**

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

**RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION**

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

**PROCÉDURE****Notes de procédure**

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients devraient être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est effectué manuellement, il est réalisé de manière adéquate en dirigeant un flux énergétique de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.

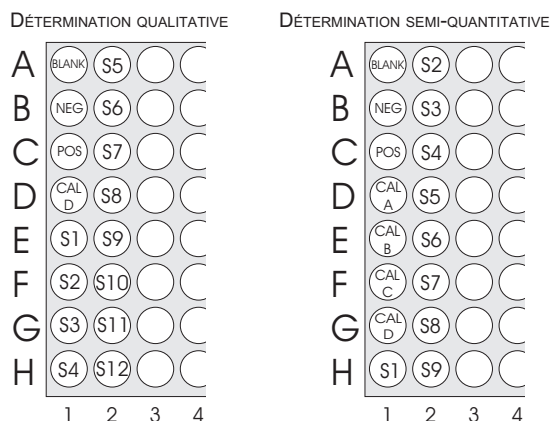
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.
- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

### Méthode de test

**Étape 1** Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.

**Étape 2** Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer l'emplacement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.

**Étape 3** Pour une détermination qualitative, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (fiolle avec couvercle jaune).  
**ou** Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



**Étape 4** Préparer une dilution **1:201** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **1.0 ml** de diluant de sérum.

**Étape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.

**Étape 6** Pipeter **100 µl** des calibreurs prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés, conformément au feuillet de protocole.  
**Note** : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.

**Étape 7** Incuber pendant 30 minutes ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Étape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque micropuits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.

**Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.

**Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.

**Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.

FR

- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.
- Étape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits, en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.
- Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

### Contrôle de qualité

Des calibreurs, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibreur A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 20 IU/ml. Si l'essai est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs dans la plage figurant sur la fiole.

### RÉSULTATS

#### Calculs

Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

#### 1. DOSAGE QUALITATIF

Abs. de l'échantillon d'essai

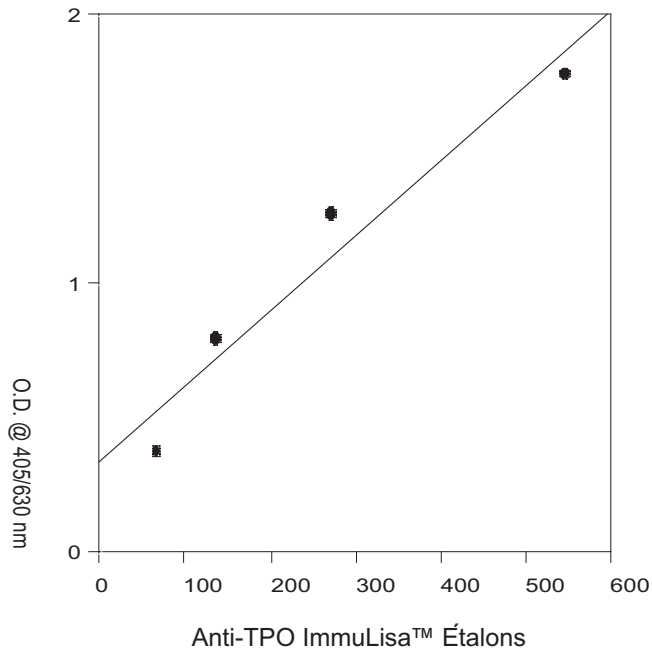
----- X IU/ml du calibreur D = IU/ml échantillon de test

Abs. du calibreur D

#### 2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibreur A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en IU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorption sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.

Anti-TPO Immulisa™ Courbe standard



### Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination IU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Ces valeurs ont été déterminées en testant 80 donateurs de sang normaux. Les valeurs fournies ci-dessous représentent la moyenne des sujets normaux plus 2SD. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeur anti-TPO	Interprétation
≤20 IU/ml	Négatif
>20 IU/ml	Positif

### LIMITES DE LA PROCÉDURE

Des auto-anticorps thyroïdiens peuvent également être présents dans les maladies non-thyroïdiennes. Les résultats obtenus à la suite de cet essai ne représentent pas un diagnostic pour la maladie thyroïdienne et doivent être pris en considération en même temps que le captage de l'iode et d'autres tests thyroïdiens standards et que le tableau clinique du patient.

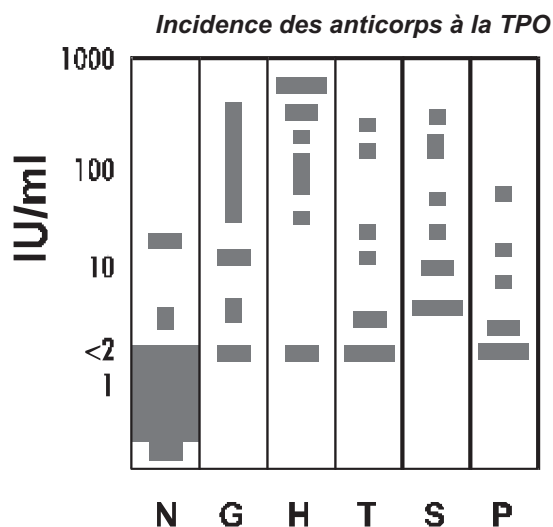
### VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives. Cependant, on a remarqué que 5-10% d'individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent apparaître positifs aux anticorps thyroïdiens. L'incidence de ces auto-anticorps augmente avec l'âge.

Le tableau et la figure ci-dessous montrent l'incidence des auto-anticorps thyroïdiens dans les situations normales et dans les situations de maladie en utilisant des plaques à antigène Immulisa™. Les anticorps anti-peroxydase thyroïdienne se manifestent essentiellement dans la maladie de Graves, d'Hashimoto, dans le goitre nodulaire toxique et dans l'association avec certains autres troubles autoimmuns, tel que le lupus érythémateux systémique (SLE).

**Signification des anticorps thyroïdiens**

Spécificité Ab	Association maladie	Indications pour l'utilisation
<b>Thyroglobuline (Tg)</b>	1) maladies thyroïdiennes autoimmunes 2) niveaux thyroglobuline incorrects	complément aux niveaux thyroglobuline
<b>Microsomal (TPO)</b>	Maladie thyroïdienne autoimmune	1) Goitre à éthyologie inconnue 2) Hyperthyroïdisme



N = Normaux (99), G = Maladie de Grave (25), H = Maladie de Hashimoto (15), T = Goitre toxique multi nodulaire (11), S = Lupus érythémateux disséminé (20), P = Cirrhose biliaire primaire (9)

**DONNÉES DE RENDEMENT**

Les résultats obtenus avec le test ELISA anti-TPO ImmuLisa™ ont été comparés avec d'autres essais présents dans le commerce.

		ImmuLisa™		Total
		Positif	Négatif	
Autres ELISA	Positif	42	14	56
	Négatif	4	62	66
	Total	46	76	122

Concordance relative : 85,2%

Sensibilité relative : 75%

Spécificité relative : 94%

**Précision :**

Trois sérums positifs anticorps anti-TPO ont été testés avec ELISA anti-TPO ImmuLisa™ afin de déterminer la variabilité inter et intra-dosage. Les résultats figurent ci-dessous :

	valeur moyenne	inter-dosage	intra-dosage
	IU/ml	%CV	%CV
Échantillon 1	196,6	10,8	6,6
Échantillon 2	155,8	12,3	8,0
Échantillon 3	110,9	18,0	7,5

FR

**Récupération :**

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps anti-TPO ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps. Les niveaux des anticorps anti-TPO des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :

	<b>TPO-Ab conc. ajouté (IU/ml)</b>	<b>TPO-Ab conc. obtenu (IU/ml)</b>	<b>% Récupération</b>
<b>Échantillon 1</b>	275,0	244,3	88,9
<b>Échantillon 2</b>	183,0	175,3	95,8
<b>Échantillon 3</b>	116,0	107,0	92,2



**IMMCO**  
DIAGNOSTICS

## Anticorpi Anti-Perossidasi Tiroidea (TPO) ELISA

IVD

### INSERTO DEL PRODOTTO

REF 1132 Anticorpi anti-TPO ELISA 96 Determinazioni

#### FINALITA' D'USO

Test immunoenzimatico (ELISA) per la rilevazione qualitativa e la quantificazione di anticorpi anti-TPO nel siero umano come strumento di aiuto nella diagnosi di alcuni disturbi tiroidei – tiroidite di Hashimoto, malattia di Graves e gozzo non tossico.

#### SOMMARIO E SPIEGAZIONE DEL TEST

Lo spettro clinico delle tiroiditi autoimmuni e dei pazienti affetti da queste patologie può essere di tipo iperattivo, ipoattivo o addirittura eutiroideo. Esistono due forme principali di tiroiditi autoimmuni, la malattia di Graves e la tiroidite di Hashimoto. Le reazioni tiroidee autoimmuni possono manifestarsi anche in altre anomalie tiroidee come il gozzo sporadico e endemico, il morbo di Plummer e l'oftalmopatia endocrina<sup>1-5</sup>.

Nei pazienti affetti da questi disturbi è spesso associata la presenza di autoanticorpi anti-tiroglobulina e di antigeni anti-perossidasi tiroidea (TPO). La tiroglobulina (Tg) è una glicoproteina omodimerica da 660 kD con funzione di proormone tiroideo. Il TPO è un enzima di 105 kD legato alla membrana che catalizza la biosintesi dell'ormone tiroideo. Tiroxina e tri-iodo tironina sono generate dalla iodinazione catalizzata dal TPO e dall'accoppiamento a tiroxine omogeneiche specifiche. La misurazione di autoanticorpi contro tiroxina e TPO è importante nella diagnosi delle malattie tiroidee autoimmuni. Questi anticorpi possono essere misurati con vari metodi quali l'immunofluorescenza indiretta, l'emagglutinazione passiva e il metodo ELISA.

#### PRINCIPI DELLA METODICA

Il test viene eseguito come test immunoenzimatico (ELISA) in fase solida. I pozzetti vengono rivestiti con l'antigene TPO nativo; segue poi il blocco dei siti che non hanno reagito, per ridurre i legami non specifici. Controlli, calibratore e campioni di siero del paziente vengono incubati nei pozzetti rivestiti di antigene, e ciò permette agli anticorpi specifici presenti nel siero di legarsi all'antigene TPO. L'anticorpo non legato e altre proteine sieriche vengono rimossi lavando i pozzetti.

Gli anticorpi legati vengono rilevati da un coniugato anti-IgG umane marcato con enzima aggiunto ai pozzetti. Il coniugato non legato viene rimosso mediante lavaggio.

Nei pozzetti viene poi aggiunto un substrato enzimatico specifico (pNPP) e la presenza di anticorpi viene rivelata da un cambiamento di colore prodotto dalla conversione del substrato pNPP in un derivato colorato della reazione. La reazione viene stoppata e l'intensità del cambiamento di colore, che è proporzionale alla concentrazione di anticorpo, viene letta da uno spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono espressi in Unità Internazionali per millilitro (IU)/ml.

#### REAGENTI

##### Conservazione e preparazione

Conservare tutti i reagenti a 2-8°C. **Non congelare.**

Non usare il reagente se non è limpido o se è presente un precipitato. Tutti i reagenti devono essere portati a temperatura ambiente (20-25°C) prima dell'uso.

Se conservato a 2-8°C, il tampone di lavaggio ricostituito è stabile fino alla data di scadenza del kit. Ricostituire il tampone a 1 litro con acqua distillata o deionizzata.

Le strisce con i pozzetti sono monouso.

## Precauzioni

Per uso diagnostico *in vitro*. Tutti i componenti di derivazione umana sono stati analizzati per HbsAg, HCV, HIV-1 e 2 e HTLV-I e sono risultati negativi nei test prescritti dalla FDA. Tuttavia, i derivati del sangue umano e i campioni del paziente devono essere considerati potenzialmente infettivi. Attenersi alle buone prassi di laboratorio per la conservazione, la dispensazione e lo smaltimento di questi materiali<sup>6</sup>.

ATTENZIONE – L'azide sodica ( $\text{NaN}_3$ ) può reagire con gli scarichi idraulici in piombo e rame per formare azidi metalliche altamente esplosive. Durante lo smaltimento dei liquidi, diluire con acqua corrente per evitare l'accumulo di azide. L'azide sodica può essere tossica se ingerita. In caso di ingestione riferire immediatamente l'incidente al direttore del laboratorio o al centro antiveleni.

**Per garantire la validità dei risultati è indispensabile seguire scrupolosamente le istruzioni contenute in questo foglio illustrativo.** Per eventuali sostituzioni di materiali del kit, usare solo materiali Immco Diagnostics Inc. aventi lo stesso numero di catalogo. Seguire una buona prassi di laboratorio per ridurre al minimo la contaminazione microbica e crociata di reagenti durante la manipolazione. Non utilizzare il prodotto oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.


## Materiali forniti

Anticorpi anti-TPO ELISA ImmuLisa™ **REF** 1132

I kit contengono reagenti sufficienti ad eseguire 96 determinazioni ciascuno.

12 x 8	<b>MICROPLATE TPO</b>	<b>Micropiastra</b> con micropozzetti asportabili rivestiti con antigene TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR A TPO</b> *	<b>Calibratore A</b> (tappo verde) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-TPO
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR B TPO</b> *	<b>Calibratore B</b> (tappo viola) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-TPO
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR C TPO</b> *	<b>Calibratore C</b> (tappo blu) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-TPO
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR D TPO</b> *	<b>Calibratore D</b> (tappo giallo) pronto all'uso. Siero umano contenente anticorpi anti-TPO
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL + TPO</b> *	<b>Controllo Positivo</b> (tappo rosso) pronto all'uso. Contiene siero umano positivo per anticorpi anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL -</b> *	<b>Controllo Negativo</b> (tappo bianco) pronto all'uso. Contiene siero umano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ ALKPHOS</b> *	<b>Coniugato in Fosf. Alc. anti-IgG umane pronto all'uso;</b> di colore rosa.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente siero</b> pronto all'uso; di colore blu.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato Enzimatico pronto all'uso.</b> Contiene pNPP. <b>Proteggere dalla luce.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Soluzione di Stop</b> pronta all'uso.
2 x	<b>BUF WASH</b>	<b>Tampone di Lavaggio</b> in polvere. Ricostituire a un litro ciascuno.

\* Contiene < 0,1%  $\text{NaN}_3$

**Simboli usati sulle etichette:** Numero di lotto Numero catalogo Scadenza Temperatura di conservazione Leggere le istruzioni per l'uso Uso diagnostico in vitro Produttore Numero di test**Materiali necessari ma non forniti**

- Acqua distillata o deionizzata
- Flacone per contenere il tampone di lavaggio diluito.
- Pipette con capacità di dispensazione da 5 µl a 1000 µl
- Puntali monouso delle pipette
- Provette per analisi 12 x 75 mm pulite e rack per provette
- Timer
- Carta assorbente
- Lettore di micropiastre per la lettura di valori di assorbanza a 405 nm. Se è disponibile un lettore di micropiastre a doppia lunghezza d'onda, il filtro di riferimento deve essere impostato a 600-650 nm.
- Lavatore automatico per micropiastre, in grado di dispensare 200 µl

**RACCOLTA DEL CAMPIONE**

In questa procedura devono essere usati solo campioni di siero. Campioni fortemente emolizzati, lipemici o microbiologicamente contaminati possono interferire con le prestazioni del test e non devono quindi essere usati. Conservare i campioni a 2-8°C per non oltre una settimana. Per la conservazione prolungata, i campioni di siero dovrebbero essere congelati. Evitare congelamenti e scongelamenti ripetuti dei campioni.

**PROCEDURA****Note sul test**

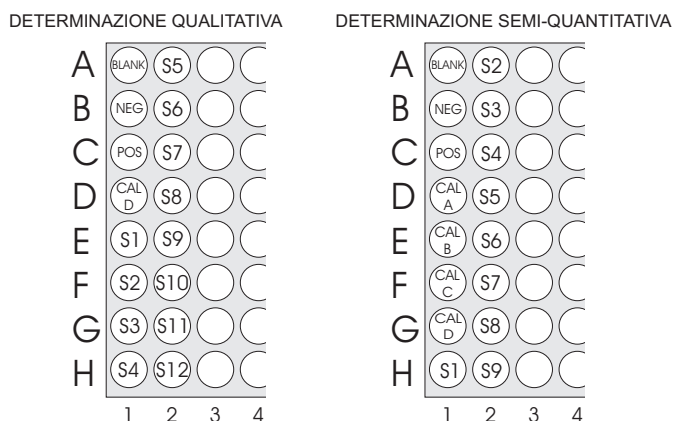
- Prima di iniziare il test leggere attentamente questo foglio illustrativo.
- Portare a temperatura ambiente i campioni di siero e i reagenti prima di iniziare la procedura di analisi. Immediatamente dopo l'uso trasferire in frigo tutti i campioni e reagenti non utilizzati.
- Prima dell'inizio del test preparare tutte le diluizioni dei campioni del paziente.
- Una buona tecnica di lavaggio è di importanza decisiva. Se il lavaggio viene eseguito manualmente, dirigere un forte getto di tampone di lavaggio con un flacone a punta larga su tutta la micropiastra. **Si consiglia di utilizzare un dispositivo automatico di lavaggio della micropiastra.**
- Usare una pipetta multicanale in grado di riempire 8 pozzetti contemporaneamente. La procedura risulta più rapida e il tempo di incubazione più uniforme.
- Per tutte le fasi è importante controllare accuratamente i tempi. Tutti i periodi di incubazione iniziano con il completamento dell'aggiunta di reagente.
- L'aggiunta di tutti i campioni e reagenti dovrebbe essere eseguita alla stessa velocità e nella stessa sequenza.

IT

- Togliere le strisce necessarie dalla busta e risigillarla accuratamente per impedire la formazione di condensa nei pozzetti non ancora utilizzati. Trasferire immediatamente la busta in frigo.

### Metodo del test

- Fase 1** Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente.
- Fase 2** Etichettare il foglio protocollo per indicare la posizione del campione nei pozzetti. E' buona prassi di laboratorio eseguire il test in duplicato.
- Fase 3** Per una **determinazione qualitativa** usare solo il Low Calibrator D pronto all'uso (*fiala con tappo giallo*). **mentre** per una determinazione **semi-quantitativa** usare i Calibratori da A a D pronti all'uso come illustrato nell'esempio di disposizione dei campioni riportato sotto:



- Fase 4** Preparare una diluizione **1:201** del campione del paziente mescolando **5 µl** di campione con **1,0 ml** di Diluente del Siero.
- Fase 5** Rimuovere i pozzetti necessari dalla busta e riporre nuovamente le strisce inutilizzate nella busta sigillata nel frigo. Sistemare in modo sicuro i pozzetti nel supporto extra fornito di corredo.
- Fase 6** Pipettare **100 µl** di Calibratore pronto all'uso, di Controllo Positivo e Negativo e di campioni del paziente negli appositi pozzetti come indicato nello schema riportato sopra.  
**Nota:** Includere un pozzetto contenente **100 µl** di Diluente del Campione come bianco. Azzerare il lettore ELISA contro il bianco.
- Fase 7** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 8** Lavare **4 volte** con il tampone di lavaggio. Per il lavaggio manuale, riempire ciascun pozzetto con il tampone di lavaggio ricostituito. Eliminare il liquido capovolgendo e sbattendo i contenuti da ciascun pozzetto o aspirando il liquido da ciascun pozzetto. Per asciugare dopo l'ultimo lavaggio, capovolgere le strisce e battere vigorosamente i pozzetti su carta assorbente. Per i dispositivi di lavaggio automatico, programmare il dispositivo secondo le istruzioni del produttore.
- Fase 9** Pipettare **100 µl** di Coniugato nei pozzetti.
- Fase 10** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 11** Lavare tutti i pozzetti come prescritto al punto 8.
- Fase 12** Pipettare **100 µl** di Substrato Enzimatico in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per il Coniugato.
- Fase 13** Incubare per **30 minuti** ( $\pm 5$  min) a temperatura ambiente.
- Fase 14** Pipettare **100 µl** di Soluzione di stop in ciascun pozzetto nello stesso ordine e con gli stessi tempi usati per l'aggiunta del substrato enzimatico. Leggere l'assorbanza entro 1 ora dall'aggiunta della Soluzione di stop.

IT

**Fase 15** Leggere l'assorbanza di ciascun pozzetto a **405 nm** usando un lettore di micropiastre con lunghezza d'onda singola o doppia (405/630nm) contro il bianco impostato su assorbanza 0.

### Controllo di Qualità

In ciascun test devono essere utilizzati calibratori, controllo positivo, controllo negativo e un bianco allo scopo di verificare l'integrità e l'accuratezza del test. La lettura dell'assorbanza del bianco deve essere <0,3. Il calibratore A dovrebbe avere una lettura dell'assorbanza non inferiore a 1, altrimenti è necessario ripetere il test. Il controllo negativo deve essere inferiore <20 IU/ml. Se il test viene eseguito in duplicato, per determinare le IU/ml si deve prendere la media delle due letture. Se si eseguono le determinazioni qualitative, la densità ottica del calibratore D deve essere maggiore di quella del controllo negativo e minore dell'assorbanza del controllo positivo. Nelle determinazioni semiquantitative il controllo positivo deve dare valori che rientrano nell'intervallo indicato sul flacone.

### RISULTATI

#### Calcoli

Le concentrazioni dei campioni del paziente possono essere determinate con uno dei due metodi seguenti:

#### 1. DETERMINAZIONE QUALITATIVA:

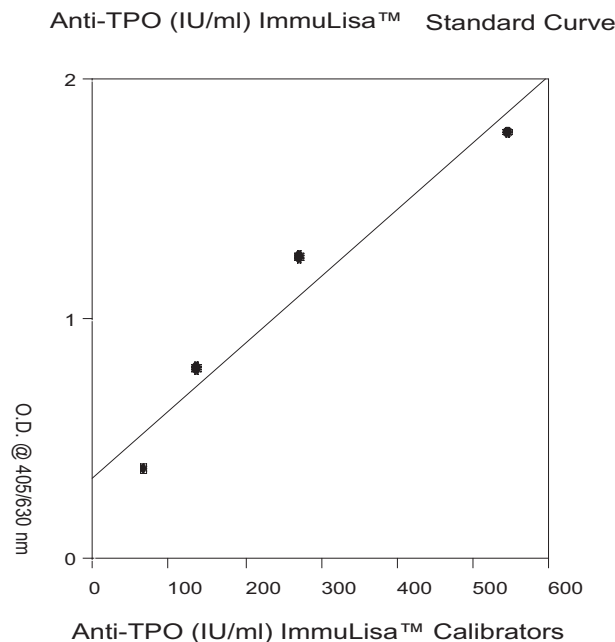
Assorbanza del campione del test

$$\text{-----} \times \text{ IU/ml di Calibratore D} = \text{IU/ml del Campione}$$

Assorbanza del calibratore D

#### 2. DETERMINAZIONE SEMIQUANTITATIVA:

Tracciare l'assorbanza dei calibratori da A a D contro la loro rispettiva concentrazione su una carta millimetrata lineare-lineare. Tracciare la concentrazione in IU/ml sull'asse X contro l'assorbanza sull'asse Y e disegnare la curva. Determinare le concentrazioni dei campioni del paziente dalla curva contro il suo corrispondente valore di assorbanza.



#### Calibratore

I calibratori pronti per l'uso servono per la semiquantificazione e devono essere usati in ciascuna serie di analisi. I campioni di pazienti contenenti livelli di anticorpo più alti possono dare valori di assorbanza maggiori di quelli del calibratore A. Per determinare valori semiquantitativi accurati, tali campioni di siero devono essere ulteriormente

diluiti, in modo da farli rientrare nell'intervallo della curva del calibratore quando testati nuovamente. Per determinare le IU/ml moltiplicare le unità ottenute per il fattore di diluizione.

### Interpretazione

Quanto segue serve solo da guida nell'interpretazione dei risultati. Questi valori sono stati determinati analizzando campioni da 80 donatori adulti normali. I valori illustrati sotto corrispondono alla media dei valori da individui normali + 2DS. Ciascun laboratorio deve stabilire i propri valori normali.

Valori Anti-TPO	Interpretazione
≤20 IU/ml	Negativo
>20 IU/ml	Positivo

### LIMITAZIONI DEL TEST

Gli autoanticorpi tiroidei possono essere presenti in disturbi non tiroidei. I risultati ottenuti con questa analisi presi singolarmente non hanno valenza diagnostica per le malattie tiroidee e dovrebbero essere considerati in congiunzione al recupero di iodio, ad altri test standard e alle condizioni cliniche del paziente.

### VALORI ATTESI

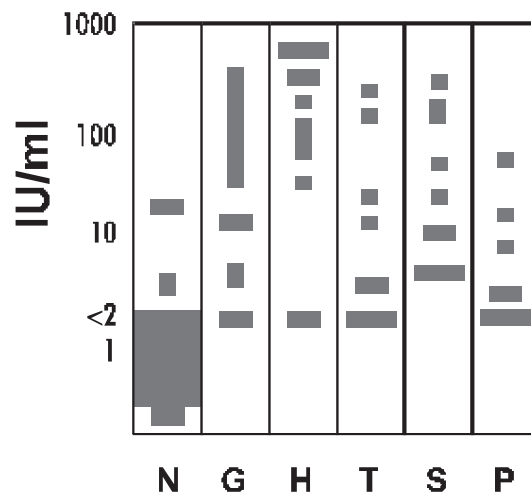
I valori attesi in una popolazione normale sono negativi. Tuttavia, il 5-10% degli individui apparentemente sani e asintomatici possono risultare positivi agli anticorpi anti-tiroidei. L'incidenza di questi autoanticorpi aumenta con l'età.

La figura e la tabella che seguono illustrano l'incidenza degli autoanticorpi tiroidei in vari stati normali e patologici misurata utilizzando piastre antigeniche ImmuLisa™. Gli anticorpi anti-TPO si riscontrano prevalentemente nella malattia di Graves, nella tiroidite di Hashimoto e nel gozzo nodulare tossico e in certi altri disturbi autoimmuni quali il LES.

#### Significatività degli Anticorpi Tiroidei

Specificità	Associazione patologica	Indicazioni per l'uso
<b>Tiroglobulina (Tg)</b>	1) malattie tiroidee autoimmuni 2) livelli anormali di tiroglobulina	Complemento ai livelli di tiroglobulina
<b>Microsomiale (TPO)</b>	Malattia tiroidea autoimmune	1) Gozzo con eziologia sconosciuta 2) Ipertiroidismo

#### Incidenza di Anticorpi anti-TPO



N=Normals (99), G=Grave's (25), H=Hashimoto's (15),  
T=Toxic Multi Nodular Goiter (11), S=Sjögren's (20),  
P=Primary Biliary Cirrhosis (9)

IT

## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

I risultati ottenuti con il kit anti-TPO ELISA ImmuLisa™ sono stati comparati con un altro kit disponibile in commercio.

		ImmuLisa™		
		Positivo	Negativo	Totale
Altro ELISA	Positivo	42	14	56
	Negativo	4	62	66
	Totale	46	76	122

Concordanza: 85.2%

Sensibilità: 75%

Specificità: 94%

### Precisione:

Tre diversi sieri positivi agli anticorpi anti-TPO sono stati testati con il kit anti-TPO ELISA ImmuLisa™ per determinare la variabilità all'interno di uno stesso saggio e tra un saggio e l'altro sulla base di 10 replicati. I risultati sono elencati sotto:

	Valori medi	inter-analisi	intra-analisi
	IU/ml	%CV	%CV
Campione 1	196,6	10,8	6,6
Campione 2	155,8	12,3	8,0
Campione 3	110,9	18,0	7,5

### Recupero:

I campioni con concentrazioni note di anticorpi anti-TPO sono stati miscelati con diluizioni appropriate di un altro campione positivo con quantitativo noto di anticorpi anti-TPO. I livelli di anticorpi anti-TPO dei campioni miscelati sono stati determinati e dai valori ottenuti è stata calcolata la percentuale di recupero. I risultati sono i seguenti:

	Ass. Conc. TPO addizionato (IU/ml)	Ass. Conc. TPO ottenuto (IU/ml)	% Recupero
Campione 1	275,0	244,3	88,9
Campione 2	183,0	175,3	95,8
Campione 3	116,0	107,0	92,2



## ELISA para Anticorpos Anti- Peroxidase da Tiróide (TPO)

**IVD**

### FOLHETO DO PRODUTO

**REF** 1132 ELISA para Anticorpos Anti-TPO 96 Determinações

### APLICAÇÃO

É um teste de imun absorção enzimática (ELISA) para a detecção qualitativa e quantificação de auto-anticorpos contra a TPO em soro humano para auxiliar o diagnóstico de alguns distúrbios da tiróide - *Doença de Hashimoto*, *de Grave* e bócio não tóxico.

### RESUMO E EXPLICAÇÃO

O espectro clínico dos distúrbios auto-imunes da tiróide é amplo e o doente afectado poderá ser hiper-, hipo- ou mesmo eutiroideu. Existem duas formas principais de problemas auto-imunes da tiróide: a *Doença de Grave* e a *Tiroidite de Hashimoto*. As reacções autoimunes da Tiróide também se podem apresentar noutras anomalias da tiróide, tais como no bócio esporádico e endémico, na Doença de Plummer ou na oftalmopatia endócrina<sup>1-5</sup>.

Os doentes com estes problemas são muitas vezes associados à presença de auto-anticorpos a antígenos tiroglobulina e peroxidase da tiróide (TPO). A Tiroglobulina (Tg) é uma glicoproteína homodimérica de 660 kD que funciona como uma pró-hormona da tiróide. A TPO é uma enzima ligada à membrana de 105 kD que catalisa a biossíntese da hormona tiroideia. A Tiroxina e a Tri-iodo Tironina são formadas pela iodção catalisada pela TPO e acoplamento a tirosinas homogénicas específicas. A medição dos auto-anticorpos contra a tiroglobulina e TPO é importante para o diagnóstico das doenças auto-imunes da tiróide. Estes anticorpos podem ser medidos por diversos métodos tais como a imunofluorescência indirecta, hemaglutinação passiva e ELISA.

### PRINCÍPIOS DO PROCEDIMENTO

O Elisa é executado como um imunoensaio de fase sólida. Os micropoços são revestidos com antígeno nativo TPO seguido por um bloqueio dos locais não reactivos para reduzir a ligação não específica. As amostras de controlo, calibradores e soro do doente são incubados nos poços revestidos com antígeno o que permite a ligação dos anticorpos específicos presentes no soro ao antígeno TPO. Os anticorpos que não se ligaram e as outras proteínas do soro são eliminados com a lavagem dos micropoços.

Os anticorpos que se ligaram são detectados juntando um conjugado de IgG anti-humana marcada com enzima nos micropoços. O conjugado que se não tiver ligado é eliminado por lavagem.

Depois adiciona-se um Substrato enzimático específico (pNPP) aos poços e a presença de anticorpos é detectada por uma alteração da cor provocada pela conversão do substrato pNPP num produto de reacção colorido. A reacção é interrompida e a intensidade de alteração da cor, a qual é proporcional à concentração de anticorpos, é lida por um espectrofotómetro a 405 nm. Os resultados são apresentados em Unidades Internacionais por mililitro (UI/ml).

### REAGENTES

#### Conservação e Preparação

Conserve todos os reagentes entre 2 e 8 °C. **Não congelar.**

Não utilize o reagente se não estiver límpido ou se apresentar precipitação. Os reagentes devem estar todos à temperatura ambiente (20-25 °C) no momento da utilização.

Quando é conservado entre 2 e 8 °C, o tampão de lavagem reconstituído permanece estável até à data de validade indicada no kit. Reconstitua o tampão de lavagem em 1 litro de água destilada ou desionizada.

As tiras de micropoços revestidas só devem ser utilizadas uma vez.

### Precauções

Para uso em diagnóstico *in vitro*. Todos os componentes de origem humana utilizados foram testados contra HBsAg, VHC, VIH-1 e 2 e HTLV-I, e apresentaram resultados negativos pelos testes requeridos pela FDA. Contudo, os derivados de sangue humano e de amostras de doentes devem ser considerados potencialmente infecciosos. Devem-se respeitar as boas práticas laboratoriais de conservação, distribuição e eliminação destes materiais<sup>6</sup>.

AVISO: A azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) pode reagir com as canalizações de cobre ou chumbo e formar azidas metálicas altamente explosivas. Quando eliminar os líquidos adicione grandes quantidades de água para evitar a formação dessas azidas. A azida de sódio pode ser tóxica se for ingerida. Se ingerida, informe imediatamente o director de laboratório ou um Centro Anti-Venenos.

**As instruções devem ser seguidas exactamente como estão indicadas no folheto do kit para assegurar resultados válidos.** Não misture componentes do kit com componentes de outras origens que não sejam do mesmo número de catálogo da Immco Diagnostics Inc. Respeite as normas em vigor em matéria de processos laboratoriais para minimizar as possibilidades de contaminação microbiana ou química dos reagentes durante o seu manuseamento. Não use após a data de validade indicada no rótulo.

### Materiais fornecidos









ELISA para Anticorpos Anti-TPO ImmuLisa™ **REF** 1132

Cada kit contém reagentes suficientes para executar 96 determinações.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b> <b>TPO</b>	<b>Microplaca</b> com micropoços individuais destacáveis revestidos com antigénio TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>A</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador A pronto a usar</b> ( <i>tampa verde</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>B</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador B pronto a usar</b> ( <i>tampa violeta</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>C</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador C pronto a usar</b> ( <i>tampa azul</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b> <b>D</b> <b>TPO</b> *	<b>Calibrador D pronto a usar</b> ( <i>tampa amarela</i> ). Soro humano contendo anticorpos anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>+</b> <b>TPO</b> *	<b>Controlo positivo pronto a usar</b> ( <i>tampa vermelha</i> ). Contém soro humano positivo para anticorpos anti-TPO.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b> <b>-</b> *	<b>Controlo negativo pronto a usar</b> ( <i>tampa branca</i> ). Contém soro humano.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b> <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugado anti-humano com fosfatase alcalina</b> pronto a usar. Cor-de-rosa.
2 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluyente de soro</b> pronto a usar. Cor azul.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrato enzimático</b> pronto a usar. Contém pNPP. Proteger da luz.
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solução de paragem</b> pronta a usar.
2 x	<b>BUF</b> <b>WASH</b>	<b>Tampão de lavagem em pó.</b> Reconstituir cada unidade em um litro.

\* Contém <0,1% NaN<sub>3</sub>

**Símbolos utilizados nos rótulos:**

-  Número de lote
-  Número de catálogo
-  Prazo de validade
-  Temperatura de armazenamento
-  Ler as instruções de utilização
-  Utilização em diagnóstico in vitro
-  Fabricante
-  Número de testes

**Materiais necessários mas não fornecidos**

- Água destilada ou desionizada
- Frasco de esguicho para o tampão de lavagem diluído
- Pipetas para 5 a 1000 µl
- Pontas de pipetas descartáveis
- Tubos de ensaio limpos 12 x 75 mm e suporte para tubos de ensaio
- Temporizador
- Toalhetes de papel absorvente
- Leitor de microplacas para a leitura de valores de absorvância a 405 nm. Se estiver à disposição um leitor de microplacas de dois comprimentos de onda, o filtro de referência deve ser regulado para 600-650 nm.
- Lavador automático de microplacas com capacidade de distribuição de 200 µl

**COLHEITA E MANUSEAMENTO DA AMOSTRA**

Nesta operação só devem ser utilizadas amostras de soro. As amostras muito hemolisadas, lipémicas ou contaminadas com micróbios poderão interferir com o rendimento do teste e portanto não deverão ser utilizadas. Conserve as amostras de 2 a 8 °C e por não mais de uma semana. Para conservar as amostras de soro por mais tempo será necessário congelá-las. Evite congelamentos e descongelamentos repetidos.

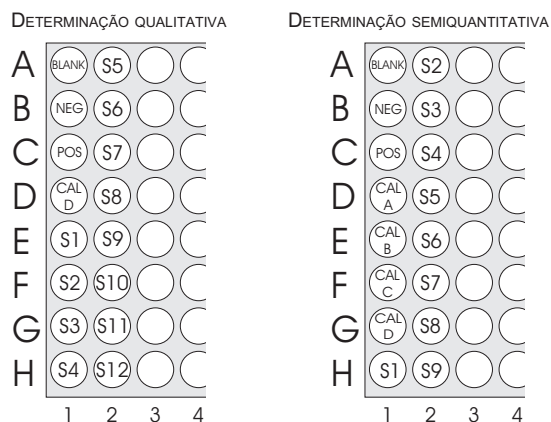
**PROCEDIMENTO****Notas sobre o procedimento**

- Leia atentamente o folheto do produto antes de iniciar o teste.
- Deixe que as amostras de soro e os reagentes do teste estabilizem à temperatura ambiente antes de iniciar o teste. Guarde imediatamente no frigorífico todas as amostras e reagentes que não forem utilizados.
- As diluições das amostras do doente devem ser todas preparadas antes de iniciar o teste.
- É essencial uma boa técnica de lavagem. Se a lavagem for executada manualmente, o método de lavagem adequado é o de aplicar um jacto forte e directo de tampão de lavagem utilizando um frasco de lavagem com uma boca larga abrangendo toda a microplaca. **Aconselha-se um lavador automático de microplacas.**
- Use uma pipeta multicanal com capacidade de distribuição em 8 poços simultaneamente. Isso torna mais rápido o processo e assegura um tempo de incubação mais uniforme.
- Em todos os passos é importante um cuidadoso controlo do tempo. O início de todos os períodos de incubação dá-se quando se adiciona o reagente.
- O adicionamento de todas as amostras e reagentes deve ser efectuado com a mesma proporção e com na mesma sequência.

- Retire do pacote as tiras de micropoços necessárias e feche bem o pacote para evitar condensação nos poços não utilizados. Guarde imediatamente o pacote no frigorífico.

### Método do teste

- Passo 1** Deixe que todos os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.
- Passo 2** Indique na folha de protocolo a colocação das amostras nos poços. É aconselhável executar o teste de amostras em duplicado.
- Passo 3** Para uma **determinação quantitativa** use somente o Calibrador D baixo, pronto a usar (*frasco com tampa amarela*).  
**ou** Para uma **determinação semiquantitativa** use os Calibradores A a D, prontos a usar, como descrito no esquema abaixo.



- Passo 4** Prepare uma diluição a **1:201** das amostras do doente misturando **5 µl** de soro do doente com **1,0 ml** de Diluente para Soro.
- Passo 5** Retire do pacote os micropoços necessários e guarde no frigorífico o pacote selado com as tiras não utilizadas. Coloque correctamente os micropoços no suporte extra fornecido.
- Passo 6** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Calibradores, prontos a usar, Controlos Positivos e Negativos e amostras do doente diluídas nos respectivos micropoços de acordo com a folha de protocolo.  
**Nota:** Inclua também um micropoço com **100 µl** de Diluente do Soro como branco de reagente. Ponha o leitor ELISA a zeros em relação ao branco de reagente.
- Passo 7** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 8** Lave **4 vezes** com tampão de lavagem. Para lavagem manual, encha cada micropoço com tampão de lavagem reconstituído. Elimine o fluido virando ao contrário e batendo com os dedos para eliminar o conteúdo de cada poço ou aspirando o líquido de cada poço. Para enxugar no fim da última lavagem, vire as tiras ao contrário e bata com força os poços em toalhetes de papel absorvente. Em caso de lavadores automáticos, programe o lavador de acordo com as instruções do fabricante.
- Passo 9** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Conjugado nos micropoços.
- Passo 10** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 11** Lave todos os micropoços como no Passo 8.
- Passo 12** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Substrato Enzimático em cada micropoço, na mesma ordem e tempos, como descrito para o Conjugado.
- Passo 13** Incube por **30 minutos** ( $\pm 5$  min) à temperatura ambiente.
- Passo 14** Com uma pipeta, deite **100 µl** de Solução de Paragem em cada micropoço na mesma ordem e tempos descritos para o Substrato Enzimático. Leia os valores de absorvância no prazo de 1 hora depois de juntar a Solução de Paragem.

PT

**Passo 15** Leia a absorvância de cada micropoço a **405 nm** usando um leitor de microplacas com comprimento de onda simples ou duplo a 405/630 nm em comparação com o branco de reagente definido em absorvância zero.

### Controlo de qualidade

Os Calibradores, os Controlos Positivo e Negativo e o branco de reagente devem ser ensaiados em cada teste para verificar a integridade e a precisão do teste. A leitura da absorvância do branco de reagente deverá ser < 0,3. O Calibrador A deverá ter uma leitura de absorvância não inferior a 1,0, caso contrário o teste deverá ser repetido. O controlo negativo deve ser < 20 UI/ml. Se o teste for efectuado em duplicado, para determinar as UI/ml deverá ser calculada a média das duas leituras. Quando se efectuam determinações qualitativas, a densidade óptica do Calibrador D deve ser superior à absorvância do controlo negativo e inferior à do controlo positivo. Para determinações semiquantitativas, o controlo positivo deve dar valores dentro do intervalo indicado na ampola.

## RESULTADOS

### Cálculos

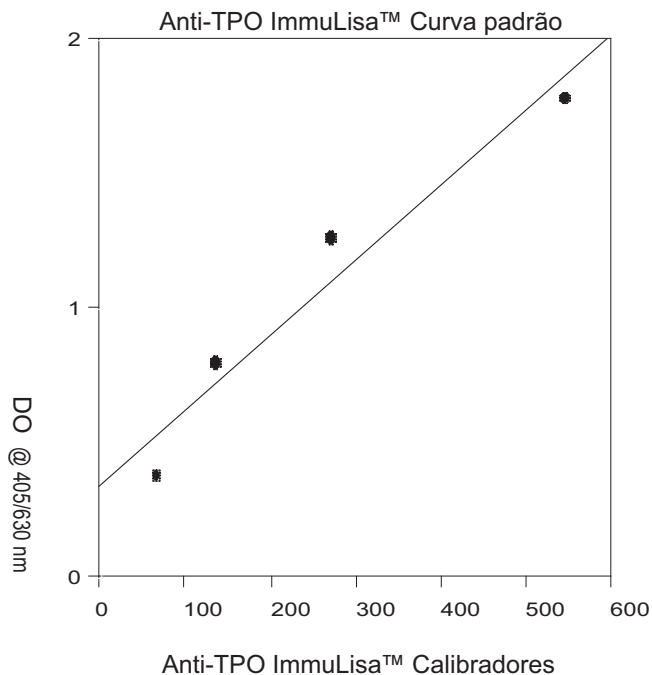
As concentrações das amostras do doente podem ser determinadas em dois métodos:

#### 1. DETERMINAÇÃO QUALITATIVA

$$\frac{\text{Abs. da Amostra de Teste}}{\text{Abs. do Calibrador D}} \times \text{UI/ml do Calibrador D} = \text{UI/ml da Amostra de Teste}$$

#### 2. DETERMINAÇÃO SEMIQUANTITATIVA

Registe a absorvância dos Calibradores A a D em relação à respectiva concentração num papel milimétrico linear. Trace a concentração em UI/ml na coordenada X em relação à absorvância na coordenada Y e desenhe a curva de melhor ajuste. Determine as concentrações das amostras do doente a partir da curva em relação ao correspondente valor de absorvância.



### Calibrador

Os calibradores prontos a usar são incluídos para assegurar uma semiquantificação e devem ser usados em todos os testes. As amostras dos doentes com níveis de anticorpos mais elevados devem dar valores de absorvância

PT

mais elevados do que os do Calibrador A. Para a determinação com precisão dos valores semiquantitativos essas amostras de soro devem ser mais diluídas de modo que entrem no intervalo da curva do calibrador quando forem novamente testadas. Para a determinação de IU/ml, multiplique as unidades obtidas pelo factor de diluição.

### Interpretação

As seguintes informações servem apenas como guia na interpretação dos resultados de laboratório. Esses valores foram determinados testando 80 dadores de sangue normal. Os valores abaixo descritos são a média dos normais mais 2 DP. Cada laboratório deve determinar os seus próprios valores normais.

Valor Anti-TPO	Interpretação
< 20 IU/ml	Negativo
> 20 IU/ml	Positivo

### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Os auto-anticorpos contra a tiróide também podem estar presentes não só em distúrbios da tiróide. Os resultados dos testes obtidos por este teste, só por si não diagnosticam uma doença da tiróide e devem ser considerados em conjunção com o aumento de iodo e outros testes padronizados da tiróide e a condição clínica do doente.

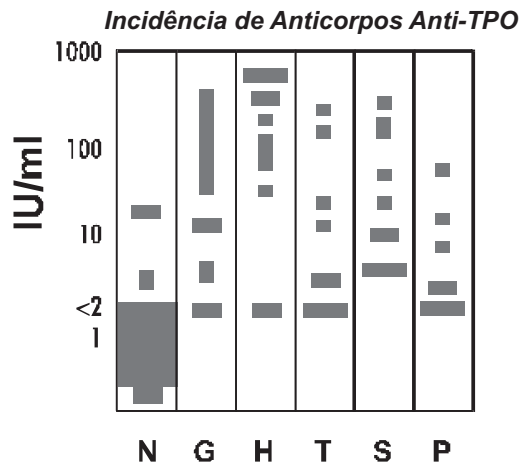
### VALORES PREVISTOS

Os valores previstos numa população normal são negativos. Todavia, 5 a 10% de aparentemente saudáveis, indivíduos assintomáticos, podem dar resultado positivo a auto-anticorpos contra a tiróide. A incidência destes auto-anticorpos aumenta com a idade.

A tabela e a figura seguintes descrevem a incidência de auto-anticorpos contra a tiróide em pessoas normais e em diversos estados de doença usando placas de antigénios ImmuLisa™. Os anticorpos anti-TPO apresentam-se principalmente nas doenças de *Grave*, de *Hashimoto*, bócio nodular tóxico e em associação com outros problemas auto-ímunes, tais como o LES.

#### Importância dos Anticorpos Anti-Tiróide

Especificidade dos Ac Tiroglobulina (Tg)	Associação com Doença	Indicações para o uso
Microsomal (TPO)	1) doenças auto-ímunes da tiróide	complementar aos níveis de tiroglobulina
	2) níveis incorrectos de tiroglobulina	1) Bócio de etiologia desconhecida
	Doença auto-imune da tiróide	2) Hipertiroidismo



N = normais (99) G = Doença de Grave (25) H = Doença de Hashimoto (25)  
T = Bócio multinodular tóxico (15) S = LES (20) P = Cirrose biliar primária (9)

PT

### CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Os resultados obtidos com o ELISA para Anticorpos Anti-TPO ImmuLisa™ foram comparados com os de outro teste obtido no comércio.

		ImmuLisa™		Total
		Positivo	Negativo	
Outro ELISA	Positivo	42	14	56
	Negativo	4	62	66
	Total	46	76	122

Concordância Relativa: 85,2%

Sensibilidade Relativa: 75%

Especificidade Relativa: 94%

### Precisão:

Foram testados três tipos diferentes de soros positivos a anticorpos anti-TPO com o ELISA para Anticorpos Anti-TPO ImmuLisa™ para determinar a variabilidade inter- e intra-teste baseada em 10 repetições. Os resultados estão abaixo indicados:

	valor médio	inter-teste	intra-teste
	IU/ml	%CV	%CV
Amostra 1	196,6	10,8	6,6
Amostra 2	155,8	12,3	8,0
Amostra 3	110,9	18,0	7,5

### Recuperação:

As amostras com concentrações conhecidas de anticorpos anti-TPO foram misturadas com diluições apropriadas de outra amostra positiva com quantidades conhecidas. Os níveis de anticorpos anti-TPO das amostras misturadas foram determinados e a partir dos resultados obtidos foi calculada a percentagem de recuperação. Os resultados são os seguintes:

	Conc. TPO-Ac. adicionada (IU/ml)	Conc. TPO-Ac. obtida (IU/ml)	% Recuperação
Amostra 1	275,0	244,3	88,9
Amostra 2	183,0	175,3	95,8
Amostra 3	116,0	107,0	92,2

**REFERENCES • ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA**

1. Mooij P, Drexhage HA. Autoimmune thyroid disease. *Clini Lab Med.* 13:683-697, 1993.
2. Champion BR, Cooke A, Reyner DC. Thyroid autoimmunity. *Curr Opinion Immunol.* 4:770-778, 1992.
3. Lindstedt G, Berg G, Jansson S, et al Clinical use of laboratory thyroid tests and investigations. *J Int Fed Clin Chem* 6:136-141, 1994.
4. Pashke R, Vogg M, Swillens S, Usadel KH. Correlation of microsomal antibodies with the intensity of the intrathyroidal autoimmune process in Grave's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:939-943, 1993.
5. Sundbeck G, Eden S, Jagenburg R, et al. Prevalence of serum anti-thyroid peroxidase antibodies in 85 year-old women and men. *Clin Chem*; 41:707-712, 1995.
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395], 1993.







*For technical assistance please contact:*

**IMMCO Diagnostics, Inc.**

**60 Pineview Drive**

**Buffalo, NY 14228-2120**

**Telephone: (716) 691-0091**

**Fax: (716) 691-0466**

**Toll Free USA/Canada: 1-800-537-TEST**

**E-Mail: [info@immco.com](mailto:info@immco.com)**

*or your local product distributor*



EU Authorized Representative/Autorisierter Repräsentant/Rappresentante

AutORIZZATO/Representante Autorizado/Représentant Autorisé

EMERGO Group, Inc.

Molenstraat 15, 2513 BH, The Hague,

The Netherlands

Tel (+31) 345 8570, Fax (+31) 346 7299

[www.emergogroup.com](http://www.emergogroup.com)