

DIASTAT[®]

Anti-Thyroglobulin (Tg)

For professional use only
Usage reserve aux professionnels
Sólo para uso profesional
Nur für den fachgebrauch
Solo per uso professionale
Endast för professionell användning



Document No. E-23-0106-08
January, 2014

DIASTAT[®] Anti-Thyroglobulin (Tg)

English:	page	2
Français:	page	14
Español:	página	27
Deutsch:	Seite	40
Italiano:	pagina	53
Svenska:	sida	65

REF

FATG 200

IVD



ENGLISH: INTENDED USE

The DIASTAT[®] anti-thyroglobulin (anti-Tg) test is a quantitative/qualitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of autoantibodies specific for thyroglobulin in human serum or EDTA, Li-Heparin or citrated plasma. It is intended to aid in the diagnosis of autoimmune thyroid disorders and is not definitive in isolation. Autoantibody levels represent one parameter in a multicriterion diagnostic process.

INTRODUCTION





Thyroglobulin (Tg), thyroid peroxidase (TPO) and the TSH receptor are considered the major autoantigens associated with chronic autoimmune thyroiditis. Clinical diagnosis is usually based on the presence of serum or plasma autoantibodies to Tg and TPO¹. In Graves' disease (chronic primary hyperthyroidism), the TSH receptor is the antigen most directly involved in clinical manifestations of the disease².

Thyroglobulin, a 660kD water-soluble glycoprotein³, is the precursor of the thyroid hormones tri-iodothyronine and thyroxine. The presence of anti-Tg autoantibodies in patients with Hashimoto's thyroiditis was first demonstrated in 1956 by Roitt et al⁴ using gel diffusion precipitation. Anti-Tg autoantibodies are predominantly of the IgG class⁵. They are detected, often with TPO autoantibodies, in the majority of Graves' disease and Hashimoto's, including other variants of chronic primary hypothyroidism such as myxoedema and asymptomatic thyroiditis. They have also been detected in spontaneous or post-partum painless thyroiditis⁶, in thyroid autoimmunity with rheumatoid arthritis^{7,8}, and in non-thyroid autoimmune diseases such as Addison's disease and Type 1 diabetes mellitus⁸. Depending upon methodology and assay cut-off, they are also detected in 1.3% to 14.6%^{8,9} of apparently healthy asymptomatic subjects. The role of circulating Tg autoantibodies is unclear; they may simply be indicators of disease as, unlike TPO autoantibodies, they do not appear to be pathogenic.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with purified human Tg antigen. During the first incubation, specific autoantibodies in diluted serum or plasma bind to the antigen-coated surface. The wells are then washed to remove unbound components. In the second incubation, the Conjugate, enzyme-labelled antibodies to human IgG, binds any surface-bound autoantibodies. After further washing, specific autoantibodies are traced by incubation with the Substrate. Addition of Stop Solution terminates the reaction, resulting in a coloured end-product. The amount of Conjugate bound is measured in absorbance units. In the qualitative protocol, the amount of Conjugate bound by the sample is compared with that bound by the Reference Control. In the quantitative protocol, the concentration of anti-Tg autoantibody can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on Standards. The Standards are referenced against the International Reference Preparation of anti-thyroglobulin 65/93.

KIT COMPONENTS

A	IgG Conjugate 1	1 x 15 mL	Alkaline phosphatase-labelled antibodies to human IgG, Tris buffer, protein stabiliser, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
B	Substrate	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage.	
C	Stop Solution	1 x 15 mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Ready-to-use.	
D	Wash Buffer Concentrate (16X)	3 x 25 mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
E	Tg-Coated Wells and Strip Holder	12 x 8 well microtitre strips	Coated with Tg antigen, in a resealable foil pack with desiccant. Colour-coded ROYAL BLUE . Individual wells can be broken off from each microtitre strip.	
F	Sample Diluent Concentrate (5X)	1 x 25 mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
1-5	Anti-Tg Standards	5 x 1.0 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 100, 400, 1500, 5000 IU/mL. Ready-to-use.	
6	Anti-Tg Reference Control	1 x 1.5 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. Ready-to-use.	
+/-	Positive Control Negative Control	1 x 0.2 mL 1 x 0.1 mL	Human plasma, <0.1% (w/v) sodium azide. Dilute 1:101 with diluted Sample Diluent before use, as for samples.	
	Pack Leaflet			

STORAGE OF REAGENTS

Opened Kit Stability

A kit was opened and reused on three occasions over a three month period with no adverse effect on kit performance.

Handling and Procedural Notes

1. Store kit components at 2-8° C and use until the expiry date on the labels. Do not use expired reagents.
2. Do not mix different lot numbers.
3. Do not freeze kits.
4. Wash Buffer Concentrate, Sample Diluent Concentrate and Positive and Negative Controls must be diluted before use. All other reagents are ready-to-use.
5. Diluted Wash Buffer and diluted Sample Diluent are stable at 2-8° C for up to 6 months if microbial contamination is avoided.
6. Replace surplus microtitre strips in the foil pack and store with the desiccant at 2-8° C, until required.
7. The plate holder is adapted for use with snappable wells only.
8. Do not expose Substrate to light during storage.
9. Avoid contamination of reagents. Use a new disposable pipette tip for each reagent or sample manipulation.

Indications of Deterioration

The Substrate should be pale yellow in colour. Pink colouring indicates contamination and the reagent must be discarded. Turbidity or precipitation in any component indicates deterioration and the component should be discarded.

Sample Collection and Storage

The assay is recommended for serum/EDTA, Li-Heparin or citrated plasma samples; do not use lipaemic, haemolysed or turbid samples. Thoroughly mix thawed samples before assay and avoid repeated freeze/thawing. Do not heat-inactivate samples, this may yield false positive results. Samples may be stored undiluted or at 1:101 dilution in diluted Sample Diluent at -20° C or 2-8° C for two weeks.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *in vitro* diagnostic use only.

Safety Precautions

1. Adhere strictly to the instructions in this booklet, particularly for handling and storage conditions.
2. Standards and Controls contain human plasma tested by FDA-cleared assays for hepatitis B surface antigen, HCV, HIV antigen and HIV antibodies and found to be non-reactive/negative. As no known test offers complete assurance that infectious agents are absent, Standards and Controls should be considered potentially infectious and handled with the same precautions as any other potentially biohazardous material. The CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3rd edition, 1993, describes how these materials should be handled in accordance with Good Laboratory Practice. This is applicable in the USA.
3. Do not pipette by mouth.
4. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where kits and samples are handled.
5. Any skin complaints, cuts, abrasions and other skin lesions should be suitably protected.
6. The Standards, Controls, Conjugate, Sample Diluent Concentrate and Wash Buffer Concentrate contain sodium azide which can react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. On disposal, drain with large quantities of water to prevent azide build-up.
7. The Stop Solution contains sodium hydroxide. Avoid contact with skin, eyes and mucous membranes. Spillage should be mopped up with copious amounts of water. If contact with skin or eyes occurs, irrigate with water and seek medical attention immediately.
8. The substrate contains PMP, Bronidox L and Diethanolamine. Avoid contact with skin, eyes and respiratory system. If contact with skin, eyes or respiratory system occurs, rinse with water and seek medical advice.
9. Material safety data sheets for all hazardous components contained in this kit are available on request from Euro Diagnostica.



Warning

B.

SUBS

Contains: Diethanolamine

H319:	Causes serious eye irritation.
P264:	Wash hands thoroughly after handling.
P280:	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
P305+P351+P338:	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313:	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.



C.

SOLN	STOP
------	------

Warning

Contains: Sodium hydroxide

- H315: Causes skin irritation.
 H319: Causes serious eye irritation.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P302+P352: IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
 P305+P351+P338: IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
 P332+P313: If skin irritation occurs: Get medical advice/attention.
 P337+P313: If eye irritation persists: Get medical advice/attention.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Warning

Contains: Sodium azide

- H302: Harmful if swallowed.
 EUH032: Contact with acids liberates very toxic gas.
 H412: Harmful to aquatic life with long lasting effects.
 P264: Wash hands thoroughly after handling.
 P280: Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
 P301+P312: IF SWALLOWED: Call a POISON CENTER or doctor/physician if you feel unwell.
 P273: Avoid release to the environment.

PREPARATION

Materials/Equipment Required but not Provided

1. 96 well plate/strip reader with 550nm filter (540-565nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10µL, 100µL, 1mL. Automatic pipette to dispense 100µL. Automatic pipette to dispense 200µL for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1x100mL, 1x400mL.
4. 1mL volume containers.
5. Distilled/deionised water.
6. Paper towels.
7. Timer for 30 and 60 minute intervals.

Preparation for the Assay

Allow all kit components, including the microtitre strips, to warm up to 18-25° C for 30-60 minutes before use. Mix reagents by gentle inversion.

Do not dilute the Reference Control.

Dilute the following reagents and mix thoroughly.

Reagent	Volume	Add
Wash Buffer Concentrate	1 vial	375 mL distilled/deionised water
Sample Diluent Concentrate	1 vial	100 mL distilled/deionised water
Positive and Negative Controls/samples	10µL	1 mL diluted Sample Diluent

Microtitre wells are supplied in strips of eight. If other than a multiple of eight wells are required, proceed as follows.

1. Remove strip from holder by pushing underside of wells.
2. Snap off required number of wells.
3. Hinge rectangular hole into bottom edge (to H) of the holder groove.
4. Ensure the square hole, with nick on left, is firmly held along the top edge (row A).

ASSAY PROTOCOL

Qualitative protocol: run Reference Control, Positive and Negative Controls, and samples.

Quantitative protocol: run Standards (1-5), Positive and Negative Controls, and samples.

1. Reference wells for identification.
2. Pipette 100µL Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls, and pre-diluted patient samples into appropriate wells. Remember to change pipette tips between additions. This step should not exceed 15 minutes for any one set of Standards/Controls/samples.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Decant strip contents by quick inversion over a sink suitable for the disposal of biological materials, bearing in mind the potential infective hazard of the samples. Blot inverted strips well with paper towels.
5. Wash wells **five times** with a minimum of 200µL diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100µL IgG Conjugate 1 to each well.
7. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100µL Substrate to each well.
10. Incubate 30±5 minutes at 18-25°C. **Do not decant.**
11. Add 100µL Stop Solution to each well, in the same order and rate as the Substrate. Tap wells gently to mix.
12. Read strips within 24 hours at 550nm (540-565nm).

CALCULATION AND INTERPRETATION OF RESULTS

Consider each assay separately when calculating and interpreting results.

Qualitative Protocol

Calculate the absorbance value (optical density) ratio for the Positive and Negative Controls, and for each sample.

$$\text{Absorbance Ratio} = \frac{\text{Sample or Control Absorbance Value}}{\text{mean Reference Control Absorbance Value}}$$

Users should calculate a cut-off between positive and negative samples that is specific to their patient populations. Results from the patient populations used in the Euro Diagnostica clinical trial suggest the following cut-off:

Absorbance Ratio

<0.95

≥0.95 to ≤1.0

>1.0

Result Interpretation

Negative

Borderline - recommend repeat testing

Positive

Quantitative Protocol

Plot the mean absorbance value of each Standard against \log_{10} Standard concentration (see following table) on suitable graph paper. Concentrations of Controls and samples can then be read from the standard curve; a typical plot is shown below for reference purposes, it must not be used for interpreting results. 4-parameter logistic (4PL), log/logit or spline curve fits are also satisfactory.

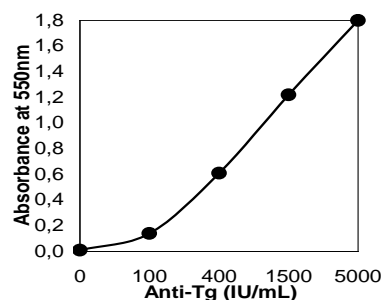
Samples with absorbances above Standard 5 (5000 IU/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as >5000 IU/mL, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

NB: As in any assay measuring antibodies, this assay determines the activity of the antibody present in the sample, rather than the concentration. Activity can be affected by a number of parameters, such as antibody avidity.

Standard Concentrations

Standard Number	Concentration IU/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Typical Standard Curve



QUALITY CONTROL

Ensure that adequate maintenance and calibration of the plate-reader is performed according to the manufacturer's instructions, and that the correct wavelength is employed.

Users should ensure they are fully acquainted with the instructions for the assay, particularly the Warnings and Precautions section, and the Handling and Procedural Notes. Users should demonstrate that they can obtain performance specifications for precision and reportable range of test results comparable to those established by the manufacturer before reporting patient test results. It is recommended that the pre-diluted Positive and Negative Controls are run in duplicate in all assays to monitor the quality of the test procedure. Run the ready-to-use Reference Control in duplicate in all qualitative assays.

Assuming the precision specifications described by the manufacturer are met, failure of any Control to meet the Control ratio specifications below renders the assay invalid and patient results should not be reported. The operator may repeat the assay, having reviewed their procedure, or contact the distributor/manufacturer. If repeating the assay, prepare a fresh dilution of each Control and sample. Laboratories may wish to include in-house controls in each assay run. Store such control material at or below -20° C and avoid repeat freeze/thaw cycles. Preservatives such as sodium azide at 0.1% (w/v) will not affect sample results.

Levels of analytes identified in particular diseases are those established by the manufacturer for specific populations, and may not necessarily mirror the literature.

Incidence levels, their relationship to specific diseases, reference ranges, and appropriate cut-off points should all be calculated for the specific populations serviced by users.

Control Ratio Specifications

Protocol	Specifications
Qualitative (ratios)	$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ see Positive Control label
	$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} < 0.95$
Quantitative	See Positive Control label for acceptable expected range (IU/mL)
	Negative Control concentration <100 IU/mL

EXPECTED VALUES

207 serum samples from asymptomatic apparently healthy donors, comprising approximately equal numbers of males and females aged between 17 and 68 years with no history of autoimmune disease, were assayed for anti-Tg antibodies of the IgG class. Three samples gave results of 582, 997, and 1396 IU/mL, these were excluded from the cut-off calculations. Using the mean value of 204 samples plus 2.5 standard deviations, the reference range was established with a cut-off of 100 IU/mL. 195/204 (95.6%) of this population gave values less than 100 IU/mL. The distribution of the 4.4% which gave values greater than 100 IU/mL is given below.

<i>Reference Range</i>
≤100 IU/mL = Negative
>100 IU/mL = Positive

No.	Anti-Tg IU/mL	% Asymptomatic Population (n=204)
6	100-119.9	2.9
-	120-139.9	-
2	140-159.9	0.97
1	160-179.9	0.48

Using this reference range, the autoantibody distribution in 116 samples from thyroid disease states was obtained. The diagnostic information is based on the putative diagnosis given by the laboratories that supplied the samples. Patients who tested positive for Paul Bunnel viraemia are also included. The distribution of results is given in the following table.

Putative Diagnosis	n	Range (IU/mL)			
		0 – 100	>100–1000	>1000–5000	>5000
Graves/Thyrotoxicosis	59	35	19	5	-
Hypothyroidism	24	11	10	3	-
Hashimoto's/Thyroiditis/Autoimmune Thyroid Disease	33	25	8	-	-
Paul Bunnel Viraemia Positive	31	30	1	-	-

PERFORMANCE DATA

Agreement with Agglutination Anti-Tg Assay

A comparative study was made with a commercially available anti-Tg agglutination test using 299 patient samples. 28 samples gave a borderline result in the agglutination assay; these were excluded from the overall agreement. The following results were obtained:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
AGGLUTINATION ANTI-Tg	+ve	53	5*
	-ve	12≅	201

Overall agreement = 93.7%. The 5* and 12≅ discrepant samples were tested in two commercially available anti-Tg ELISAs. The 5* were negative in both of these ELISAs; of the 12≅, ten were positive in one ELISA and four were positive in the second ELISA.

Agreement with ELISA Anti-Tg Assay

A comparative study was made with another anti-Tg ELISA using 169 patient samples. The following results were obtained:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
ELISA ANTI-Tg	+ve	79	6
	-ve	1	83

Overall agreement = 95.9%. The seven discrepant samples were tested in a further ELISA kit. The DIASTAT result was confirmed in 6/7 (85.7%).

Dilution Characteristics

Four dilutions of two patient samples were assayed using two kit batches. The following table shows the mean values obtained and the dilution-corrected recovery.

Sample	Dilution	Mean Value IU/mL	Dilution Corrected % Recovery
1	A	1564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Imprecision

- Intra-assay imprecision** determined by testing four controls in 12 assays, using three operators and three kit batches, with replication of four.

Control	Mean Value IU/mL	Root Mean Square %CV
1	195	5.3
2	609	7.8
3	752	6.4
4	1755	10.5

- Inter-assay imprecision** determined by testing four controls in 12 assays, using three operators and three kit batches, with replication of four.

Control	Mean Value IU/mL	SD	%CV
1	195	20.7	10.6
2	609	54.2	8.9
3	752	59.4	7.9
4	1755	254.5	14.5

LIMITATIONS OF USE

1. Although the presence of high titres of antibodies to thyroglobulin is indicative of autoimmune thyroid disease, the data must be considered in light of other clinical and laboratory findings.
2. Some individuals may have high levels of anti-Tg antibodies with little or no evidence of clinical disease. By contrast, some patients with autoimmune thyroid disease may have undetectable levels of these antibodies.
3. Low anti-Tg titres may be found in apparently healthy individuals. The clinical significance of this information is currently unclear.
4. For repeat patient sampling, e.g. for monitoring, the same type of sample (serum or EDTA, Li-Heparin or citrated plasma) should be used throughout the study period.

REFERENCES

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

SUMMARY OF PROTOCOL

1. Dilute samples and Positive and Negative Controls 1:101. Do not dilute Standards or Reference Control.
2. Add 100µL of Reference Control/Standards in duplicate, pre-diluted Positive and Negative Controls and samples into referenced wells of the microtitre strip.
3. Incubate 60±10 minutes at 18-25° C.
4. Wash strips 5 times.
5. Add 100µL of IgG Conjugate 1 to each well.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
7. Wash strips 5 times.
8. Add 100µL of Substrate to each well.
9. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
10. Add 100µL of Stop Solution to each well.
11. Read absorbance at 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Etalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoins de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

FRANÇAIS : USAGE PREVU

Le test anti-thyroglobuline (anti-Tg) DIASTAT® est un dosage immunoenzymatique quantitatif/qualitatif (méthode ELISA). Il permet de détecter les auto-anticorps spécifiques de la thyroglobuline dans du sérum ou du plasma EDTA, Li-Héparine ou citré humain. Il est destiné à aider à poser le diagnostic de troubles thyroïdiens auto-immuns, bien que son résultat à lui seul ne permette pas de poser un tel diagnostic de manière définitive. Les taux d'auto-anticorps représentent un paramètre dans un procédé diagnostique à plusieurs critères.

INTRODUCTION





La thyroglobuline (Tg), la peroxidase thyroïdienne (TPO) et le récepteur de la TSH sont considérés être les principaux auto-antigènes associés à la thyroïdite auto-immune chronique. Le diagnostic clinique repose d'habitude sur la présence d'auto-anticorps anti-Tg et anti-TPO dans le sérum ou le plasma¹. Dans la maladie de Basedow (hyperthyroïdisme primaire chronique), le récepteur de la TSH est l'antigène qui est le plus directement impliqué dans les manifestations cliniques de la maladie². La thyroglobuline, une glycoprotéine hydrosoluble de 660 kD³, est le précurseur des hormones thyroïdiennes appelées tri-iodothyronine et thyroxine. La présence d'auto-anticorps anti-Tg chez des patients avec une thyroïdite de Hashimoto a été prouvée pour la première fois en 1956 par Roitt et coll.⁴ par précipitation et diffusion sur gélose.

Les auto-anticorps anti-Tg appartiennent principalement à la classe IgG⁵. Ils sont détectés, souvent avec les auto-anticorps TPO, dans la majorité de cas des maladies de Basedow et de Hashimoto, ainsi que d'autres variantes d'hypothyroïdisme primaire chronique telles le myxoedème et la thyroïdite asymptomatique. Ils ont aussi été détectés dans la thyroïdite spontanée ou indolore post-partum⁶, dans l'auto-immunité thyroïdienne avec polyarthrite rhumatoïde^{7,8}, et dans des affections auto-immunes non thyroïdiennes telles la maladie d'Addison et le diabète sucré de Type 1⁸. En fonction de la méthodologie utilisée et des limites du dosage, ils sont aussi détectés chez 1,3 % à 14,6 %^{8,9} des sujets asymptomatiques apparemment en bonne santé. Le rôle des auto-anticorps anti-Tg en circulation n'est pas très bien compris ; il se peut qu'ils soient tout simplement des indicateurs d'une pathologie puisque, contrairement aux auto-anticorps anti-TPO, ils ne semblent pas être pathogènes.

PRINCIPE DU DOSAGE

Les cupules des bandes de micro-titrage sont enduites d'antigène associé à Tg purifié humain. Durant la première incubation, des auto-anticorps spécifiques qui se trouvent dans le sérum ou plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer les constituants non fixés. Durant la seconde incubation, le Conjugué, anticorps marqué aux enzymes et dirigé contre l'IgG humaine se fixe à tout auto-anticorps fixé à la surface. Après un autre lavage, les auto-anticorps spécifiques sont dépistés par incubation avec le Substrat. L'addition de la Solution d'arrêt met fin à la réaction, et on obtient alors un produit final coloré. La quantité de Conjugué fixé est mesurée en unités d'absorption. Dans le protocole qualitatif, la quantité de Conjugué fixée par l'échantillon est comparée à celle fixée par le Témoin de référence. Dans le protocole quantitatif, la concentration des auto-anticorps anti-Tg peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe dose-effet découlant des Etalons. Les Etalons sont comparés à la Préparation Témoin Internationale d'anti-thyroglobuline 65/93.

CONSTITUANTS DU NECESSAIRE

A	Conjugué 1, IgG	1 x 15 mL	Anticorps marqués aux phosphatases alcalines et anti-IgG humaine, tampon Tris, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , monophosphate de phénolphtaléine (MPP), solution tampon. Prêt à l'emploi. Ne pas exposer à la lumière pendant la conservation.	
C	Solution d'Arrêt	1 x 15 mL	Hydroxyde de sodium, EDTA, tampon carbonate (pH >10). Prêt à l'emploi.	
D	Concentré tampon de lavage (16X)	3 x 25 mL	Tampon borate, azoture de sodium à 0,4 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
E	Cupules enduites de Tg et Porte-bandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'antigène associé à Tg, dans une poche en aluminium refermable, contenant un desséchant. Codées BLEU ROI . Des cupules individuelles peuvent être détachées de la bande de microtitrage.	
F	Concentré diluant pour échantillons (5X)	1 x 25 mL	Tampon phosphate, stabilisateur des protéines, azoture de sodium à 0,5 % (p/v). Diluer avant l'usage.	
1-5	Etalons Anti-Tg	5 x 1,0 mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). 0, 100, 400, 1500, 5000 IU/mL. Prêt à l'emploi.	
6	Témoin de référence de anti-Tg	1 x 1,5 mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Prêt à l'emploi.	
+/-	Témoin positif Témoin négatif	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Plasma humain, azoture de sodium à <0,1 % (p/v). Diluer à 1:101 avec le diluant pour échantillons dilué avant l'usage, comme pour les échantillons.	
	Notice incluse dans le conditionnement			

CONSERVATION DES REACTIFS

Stabilité des produits du nécessaire ouvert

Un seul nécessaire a été ouvert et utilisé en trois occasions différentes durant une période de trois mois et sa performance ne s'est pas détériorée.

Remarques relatives à la manipulation et à la méthode à suivre

1. Conserver les constituants du nécessaire à 2-8° C et utiliser jusqu'à la date de péremption marquée sur les étiquettes. Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption.
2. Ne pas mélanger des numéros de lots différents.
3. Ne pas congeler les nécessaires.
4. Diluer le Concentré tampon de lavage, le Concentré diluant pour échantillons et les Témoins négatifs et positifs avant l'usage. Tous les autres réactifs sont prêts à l'emploi.
5. Le tampon de lavage dilué et le Diluant dilué pour échantillons restent stables pendant un maximum de 6 mois à 2-8° C si toute contamination microbienne est évitée.
6. Remettre les bandes de microtitrage non utilisées dans la poche d'aluminium contenant du desséchant, et conserver à 2-8° C, jusqu'à ce que l'on en est besoin.
7. Le porte-bandes a été adapté pour n'être utilisé qu'avec des cupules détachables par cassure nette.
8. Ne pas exposer le Substrat à la lumière durant la conservation.
9. Eviter la contamination des réactifs. Utiliser un nouvel embout de pipette à jeter pour chaque réactif ou chaque manipulation des échantillons.

Indications d'une détérioration

Le Substrat doit être d'une couleur jaune pâle. Une couleur rose indique qu'il y a eu contamination et le réactif doit alors être jeté. Un trouble ou une précipitation dans n'importe quel constituant indique qu'il y a eu détérioration et le constituant doit être jeté.

Prélèvement et conservation des échantillons

Le dosage est recommandé pour des échantillons de sérum/plasma EDTA, Li-Héparine ou citré; ne pas utiliser des échantillons lipémiques, hémolysés ou troubles. Bien mélanger les échantillons dégelés avant de les analyser et éviter les cycles fréquents de congélation/décongélation. Ne pas inactiver les échantillons par la chaleur car cela pourrait donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons peuvent être conservés à l'état non dilué, ou bien après une dilution à 1:101 dans du Diluant dilué pour échantillons, à -20°C ou 2-8° C pendant deux semaines.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS

Réservé à l'usage diagnostique *in vitro*.

Précautions de sécurité

1. Suivre scrupuleusement les instructions données dans ce dépliant, surtout en ce qui concerne la manipulation et les conditions de conservation.
2. Les Etalons et les Témoins contiennent du plasma humain testés avec des dosages approuvés par la FDA pour détecter la présence éventuelle de l'antigène de surface de l'hépatite B, du virus HCV, de l'antigène anti-VIH et d'anticorps anti-VIH, auxquels ils ont obtenu des résultats non réactifs/négatifs. Etant donné qu'il n'existe aucun test qui puisse garantir l'absence d'agents infectieux à 100 %, agir comme si les Etalons et les Témoins étaient potentiellement infectieux et les manipuler en prenant les mêmes précautions qu'avec toute autre substance potentiellement biologiquement dangereuse. Le Manuel de Santé du Centre épidémiologique/des Instituts nationaux de la santé (CDC/NIH), intitulé "Biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux", 3ème édition, 1993, décrit la manière de manipuler de telles substances conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Cela est applicable aux Etats-Unis.
3. Ne pas aspirer les produits avec une pipette.
4. Ne pas fumer, manger, boire ou se maquiller dans les zones de manipulation des nécessaires et des échantillons.
5. Protéger toute éruption cutané, coupure, abrasion et autre lésion cutanée de manière adéquate.
6. Les Etalons, Témoins, Conjugué, Concentré diluant pour échantillons et Concentré tampon de lavage contiennent tous de l'azoture de sodium qui peut réagir avec des tuyaux en plomb et en cuivre pour former des azotures métalliques très explosifs. Lors de l'élimination, rincer avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azoture.
7. La Solution d'arrêt contient de l'hydroxyde de sodium. Eviter tout contact avec la peau, les yeux et les muqueuses. Disperser tout déversement avec de grandes quantités d'eau. En cas de contact avec la peau ou les yeux, irriguer avec de l'eau et consulter immédiatement un médecin.
8. Le substrat contient du PMP, du Bronidox L et de la diéthanolamine. Éviter tout contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires. En cas de contact avec la peau, les yeux ou les voies respiratoires, laver avec de l'eau et consulter un médecin.
9. On peut se procurer les fiches de données de sécurité relatives à tous les constituants dangereux inclus dans le nécessaire sur demande auprès de Euro Diagnostica.



B.

SUBS

Attention

Contient: Diéthanolamine

- H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.



C.

SOLN	STOP
------	------

Attention

Contient: Hydroxyde de sodium

- H315: Provoque une irritation cutanée.
 H319: Provoque une sévère irritation des yeux.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P302+P352: EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon.
 P305+P351+P338: EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs.
 P332+P313: En cas d'irritation cutanée: consulter un médecin.
 P337+P313: Si l'irritation oculaire persiste: consulter un médecin.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attention

Contient: Azoture de sodium

- H302: Nocif en cas d'ingestion.
 EUH032: Au contact d'un acide, dégage un gaz très toxique.
 H412: Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.
 P264: Se laver soigneusement les mains après manipulation.
 P280: Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
 P301+P312: EN CAS D'INGESTION: appeler un CENTRE ANTIPOISON ou un médecin en cas de malaise.
 P273: Éviter le rejet dans l'environnement.

P R E P A R A T I O N

Substances/Équipement requis mais non inclus dans le nécessaire

1. Lecteur de plaque/bande à 96 cupules, avec filtre de 550nm (540-565nm est acceptable).
2. Pipettes de précision pour distribuer 10µL, 100µL, 1 mL. Pipette automatique pour distribuer 100µL. Pipette automatique pour distribuer 200µL pour le lavage à la main, laveur de plaques automatique (facultatif).
3. Eprouvettes à pied graduées en verre/matière plastique: 1x100mL, 1x400mL.
4. Récipients contenant 1mL.
5. Eau distillée/désionisée.
6. Serviettes en papier.
7. Minuterie pour intervalles de 30 et 60 minutes.

Préparation pour le dosage

Attendre 30 à 60 minutes pour que tous les constituants du nécessaire, y compris les bandes de microtitrage, soient à la température de 18-25° C avant de les utiliser. Mélanger les réactifs en renversant doucement les récipients.

Ne pas diluer le Témoin de référence.

Diluer les réactifs suivants et bien mélanger.

Réactif	Volume	Ajouter :
Concentré tampon de lavage	1 flacon	375 mL d'eau distillée/désionisée
Concentré diluant pour échantillons	1 flacon	100 mL d'eau distillée/désionisée
Témoins positifs et négatifs/échantillons	10 µL	1 mL de Diluant pour échantillons

Les cupules de microtitrage sont fournies en bandes de huit. Si on a besoin d'un nombre de cupules qui n'est pas un multiple de huit, procéder de la manière suivante :

1. Sortir la bande du porte-bandes en poussant sous les cupules.
2. Séparer le nombre requis de cupules de la bande en cassant net.
3. Glisser le trou rectangulaire dans la bordure du bas (en H) de la rainure du porte-bandes.
4. S'assurer que le trou carré, avec l'encoche à gauche, est fermement maintenu le long de la bordure supérieure (rangée A).

P R O T O C O L E D U D O S A G E

Protocole qualitatif Analyser le Témoin de référence, les Témoins positifs et négatifs et les échantillons.

Protocole quantitatif Analyser les Etalons (1-5), les Témoins positifs et négatifs et les échantillons.

1. Annoter les cupules afin de pouvoir les identifier.
2. Avec une pipette, prélever 100µL du Témoin de référence/Témoins, en double exemplaire, des témoins positifs et négatifs prédilués, et des échantillons du patient prédilués, puis déposer dans les cupules appropriées. Ne pas oublier de changer d'embout de pipette pour chaque addition. Cette étape ne doit pas prendre plus de 15 minutes pour n'importe quel groupe d'Étalons/Témoins/échantillons.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
4. Décanter le contenu des bandes par renversement rapide au-dessus d'un évier convenant à l'élimination de substances biologiques, en n'oubliant pas que les échantillons sont potentiellement infectieux. Bien éponger les bandes renversées avec des serviettes en papier.
5. Laver les cupules **cinq fois** avec un minimum de 200µL de Tampon de lavage dilué. **Décanter et éponger après chaque étape du lavage.**
6. Ajouter 100µL de Conjugué IgG 1 dans chaque cupule.
7. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
8. Répéter les étapes 4 et 5.
9. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
10. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C. **Ne pas décanter.**

11. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule, dans le même ordre et avec la même vitesse que le Substrat. Tapoter doucement les cupules pour mélanger.
12. Lire le résultat obtenu des bandes en l'espace de 24 heures et à 550nm (540-565nm).

CALCUL ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Considérer chaque dosage séparément lors du calcul et de l'interprétation des résultats.

Protocole qualitatif

Calculer le coefficient d'absorption (densité optique) pour les Témoins positifs et négatifs, et pour chaque échantillon.

$$\text{Coefficient d'absorption} = \frac{\text{Valeur d'absorption de l'échantillon ou du Témoin}}{\text{Valeur d'absorption moyenne du Témoin de référence}}$$

Les utilisateurs doivent calculer une valeur seuil entre les échantillons positifs et négatifs qui est spécifique de leurs populations de patients. Les résultats obtenus des populations de patients utilisées dans l'essai clinique Euro Diagnostica suggèrent la valeur seuil suivante :

Coefficient d'absorption = Interprétation des résultats

<0,95	Négatif
≥0,95 à ≤1,0	Valeur limite - il est recommandé de refaire le test
>1,0	Positif

Protocole quantitatif

Sur du papier millimétré, tracer la valeur d'absorption de chaque Etalon en fonction de la concentration Etalon log₁₀ (voir tableau ci-dessous). Les concentrations des Témoins et des échantillons peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage ; à titre de référence, une courbe type est illustrée ci-dessous, mais elle ne doit pas être utilisée pour interpréter les résultats. Des ajustements de courbe par logistique pondérée à 4 paramètres (4LP), log/logit ou spline sont aussi satisfaisants.

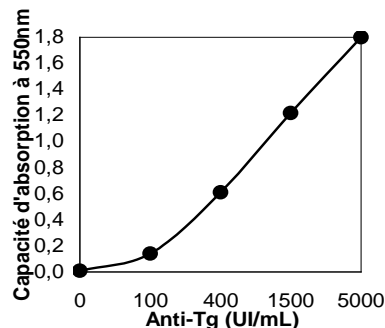
Les échantillons dont l'absorption est supérieure à l'Etalon 5 (5000 UI/mL) dépassent les limites du dosage, et ils doivent être considérés comme > 5000 UI/mL, être dilués et re-analysés, en apportant la rectification nécessaire pour ce facteur de dilution supplémentaire.

NB: Comme avec tout dosage mesurant des anticorps, ce dosage détermine l'activité de l'anticorps présent dans l'échantillon, et non la concentration. L'activité peut être affectée par plusieurs paramètres, parmi lesquels l'avidité des anticorps.

Concentrations des étalons

Numéro de l'Etalon	Concentration UI/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Courbe d'étalonnage type



CONTROLE DE LA QUALITE

S'assurer qu'un entretien et un étalonnage adéquats du lecteur de plaques ont été effectués, conformément aux instructions du fabricant, et que la longueur d'onde utilisée est correcte. Les utilisateurs doivent s'assurer qu'ils ont bien pris connaissance des instructions pour effectuer le dosage, et en particulier de la Sections sur les Mises en garde et Précautions, et des Remarques relatives à la Manipulation et à la Méthode à suivre.

Les utilisateurs doivent prouver qu'ils peuvent obtenir des spécifications de la performance pour la précision, et des limites rapportables de résultats des tests comparables à celles fixées par le fabricant avant de signaler les résultats des tests des patients. Il est recommandé d'analyser les Témoins positifs et négatifs prédilués en deux exemplaires dans tous les dosages afin de contrôler la qualité de la méthode de test. Analyser le Témoin de référence prêt à l'emploi en deux exemplaires dans tous les dosages qualitatifs.

Dans la mesure où les spécifications relatives à la précision décrites par le fabricant sont satisfaites, si un Témoin quelconque ne satisfait pas les spécifications du coefficient des Témoins indiquées ci-dessous, le dosage devient invalide et les résultats obtenus du patient ne doivent pas être communiqués. L'opérateur peut répéter le dosage, après avoir réexaminé la méthode à suivre, ou bien se mettre en contact avec le distributeur/fabricant. Si le dosage est renouvelé, préparer une solution fraîche de chaque Témoin et de chaque échantillon. Il se peut que les laboratoires désirent effectuer des contrôles internes durant chaque analyse. Conserver une telle substance témoin à une température $\leq -20^{\circ}\text{C}$, et éviter les cycles répétitifs de congélation/décongélation. Les agents de conservation tels que l'azoture de sodium n'affecteront pas les résultats obtenus avec les échantillons.

Les taux d'analytes identifiés dans des affections particulières sont ceux établis par le fabricant pour des populations spécifiques, et ils ne reflèteront pas automatiquement ceux mentionnés dans la documentation. Les incidences, leur lien avec des affections spécifiques, les limites de référence, et les points d'arrêt appropriés doivent tous être calculés pour les populations spécifiques servies par les utilisateurs.

Spécifications des coefficients des témoins

Protocole	Spécifications
Qualitatif (coefficients)	$\frac{\text{Absorption du Témoin positif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$ voir étiquette du Témoin positif
	$\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}} < 0,95$
Quantitatif	Se référer à l'étiquette du Témoin positif pour les limites attendues acceptables (UI/mL)
	Concentration des Témoins négatifs <100 UI/mL

VALEURS ATTENDUES

207 échantillons sériques provenant de donneurs en bonne santé apparemment asymptomatiques, comprenant des nombres approximativement égaux d'hommes et de femmes d'un âge compris entre 17 et 68 ans et sans antécédents d'affection auto-immune, ont été analysés pour détecter la présence éventuelle d'anticorps anti-Tg de la classe IgG. Trois échantillons ont donné des résultats de 582, 997, et 1396 UI/mL; ces valeurs ont été exclues des calculs des limites. En utilisant la valeur moyenne de 204 échantillons plus 2,5 écart-types, les limites de référence ont été déterminées avec un seuil de 100 UI/mL. 195/204 (95,6 %) de cette population ont donné des valeurs inférieures à 100 UI/mL. La répartition des 4,4 % qui ont donné des valeurs supérieures à 100 UI/mL est indiquée ci-dessous.

Limites de référence

≤100 UI/mL = Négatif

> 100 UI/mL = Positif

No.	Anti-Tg UI/mL	% Population asymptomatique (n=204)
6	100-119,9	2,9
-	120-139,9	-
2	140-159,9	0,97
1	160-179,9	0,48

En se servant de ces limites de référence, la répartition des auto-anticorps dans 116 échantillons provenant de donneurs avec des états pathologiques thyroïdiens a été obtenue. Les informations diagnostiques reposaient sur le diagnostic putatif donné par les laboratoires ayant fourni les échantillons. Les patients qui avaient obtenu un résultat positif pour la virémie de Paul Bunnel sont aussi inclus. La répartition des résultats est indiquée dans le tableau suivant.

Diagnostic putatif	n	Limites (UI/mL)			
		0 – 100	>100–1000	>1000–5000	>5000
Maladie de Basedow/Thyrotoxicose	59	35	19	5	-
Hypothyroïdisme	24	11	10	3	-
Maladie de Hashimoto/Thyroïdite/Maladie thyroïdienne auto-immune	33	25	8	-	-
Positifs pour la virémie de Paul Bunnel	31	30	1	-	-

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE

Concordance avec le dosage Anti-Tg par Agglutination

Une étude de comparaison a été effectuée avec un test d'agglutination anti-Tg vendu dans le commerce en utilisant 299 échantillons provenant de patients. 28 échantillons ont donné un résultat limite dans le test d'agglutination ; ils ont été exclus de la concordance générale. Les résultats suivants ont été obtenus :

		DIASTAT	
		+ve	-ve
AGGLUTINATION ANTI-Tg	+ve	53	5*
	-ve	12≅	201

Concordance générale = 93,7%. Les échantillons hors limites 5* et 12≅ ont été testés avec deux tests anti-Tg ELISA vendus dans le commerce. Les 5* étaient négatifs dans ces deux ELISA; parmi les 12≅, dix étaient positifs dans un ELISA et quatre étaient positifs dans le second ELISA.

Concordance avec le dosage Anti-Tg ELISA

Une étude de comparaison a été effectuée avec un autre test anti-Tg ELISA en utilisant 169 échantillons provenant de patients. Les résultats suivants ont été obtenus :

		DIASTAT	
		+ve	-ve
ELISA ANTI-Tg	+ve	79	6
	-ve	1	83

Concordance générale = 95,9%. Les sept échantillons hors limites ont été testés avec un autre nécessaire ELISA. Le résultat obtenu avec le test DIASTAT a été confirmé dans 6 cas sur 7 (85,7%).

Caractéristiques de la dilution

Quatre dilutions de deux échantillons provenant de patients ont été analysées avec deux lots de nécessaires. Les tableaux suivants indiquent les valeurs moyennes obtenues et le pourcentage récupéré rectifié en fonction de la dilution.

Echantillon	Dilution	Valeur moyenne GPL U/mL	% récupéré rectifié en fonction de la dilution
1	A	1564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Imprécision

- Imprécision intra-dosages** déterminée en testant quatre témoins dans 12 dosages, en utilisant trois opérateurs et trois lots de nécessaires, avec réplication de quatre.

Témoin	Valeur moyenne U/mL	Carré Moyen de la Racine
1	195	5,3
2	609	7,8
3	752	6,4
4	1755	10,5

- Imprécision inter-dosages** déterminée en testant quatre témoins dans 12 dosages, en utilisant trois opérateurs et trois lots de nécessaires, avec réplication de quatre.

Témoin	Valeur moyenne UI/mL	ET	%CV
1	195	20,7	10,6
2	609	54,2	8,9
3	752	59,4	7,9
4	1755	254,5	14,5

RESTRICTIONS D'UTILISATION

1. Bien que la présence de taux élevés d'anticorps dirigés contre la thyroglobuline indique la présence d'une affection thyroïdienne auto-immune, les données doivent être considérées en tenant compte des autres résultats cliniques et biologiques.
2. Chez certains individus, il peut y avoir des taux élevés d'anticorps anti-Tg mais peu ou pas de preuves d'une affection clinique. Par contre, il se peut que des patients atteints d'une affection auto-immune thyroïdienne aient des taux indétectables de ces anticorps.
3. On peut trouver des titres anti-Tg faibles chez des individus apparemment en bonne santé. L'importance clinique de ces informations n'est pas actuellement bien déterminée.
4. Pour des échantillonnages répétitifs chez un patient, par ex. à des fins de monitoring, le même type d'échantillon (sérum ou plasma EDTA, Li-Héparine ou citré) doit être utilisé durant toute la période d'étude.

REFERENCES

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

RESUME DU PROTOCOLE

1. Diluer les échantillons et les Témoins positifs et négatifs à raison de 1:101. Ne pas diluer les Etalons ou le Témoin de référence.
2. Ajouter 100µL du Témoin de référence/Etalons en double exemplaire, des Témoins positifs et négatifs pré-dilués et des échantillons dans les cupules référencées de la bande de microtitrage.
3. Faire incuber pendant 60 ± 10 minutes à 18-25° C.
4. Laver les bandes 5 fois.
5. Ajouter 100µL de Conjugué IgG 1 dans chaque cupule.
6. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
7. Laver les bandes 5 fois.
8. Ajouter 100µL de Substrat à chaque cupule.
9. Faire incuber pendant 30 ± 5 minutes à 18-25° C.
10. Ajouter 100µL de Solution d'arrêt dans chaque cupule.
11. Lire la capacité d'absorption à 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Etalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoins de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

ESPAÑOL: USO PREVISTO

La prueba anti-tiroglobulina (anti-TG) DIASTAT[®] es un análisis inmunosorbente con anticuerpo ligado a enzima (ELISA) cuantitativa/cualitativa para la detección de autoanticuerpos específicos a la tiroglobulina en suero humano o EDTA, plasma citrado o Li-Heparina. Se utiliza como ayuda para el diagnóstico de trastornos tiroideos autoinmunes y no es definitiva por sí sola. Los niveles de autoanticuerpos representan un parámetro de un proceso diagnóstico de múltiples criterios.

INTRODUCCIÓN

La tiroglobulina (Tg), la peroxidasa tiroidea (TPO) y el receptor de TSH están considerados como los autoantígenos principales asociados con tiroiditis autoinmune crónica. El diagnóstico clínico se basa, habitualmente, en la presencia de autoanticuerpos en suero o plasma a Tg y TPO¹. En la enfermedad de Graves (hipertiroidismo primario crónico), el receptor de TSH es el antígeno implicado más directamente en las manifestaciones clínicas de la enfermedad².





La tiroglobulina, una glicoproteína soluble en agua 660kD³, es la precursora de las hormonas tiroideas triyodotironina y tiroxina. La presencia de autoanticuerpos anti-Tg en pacientes con tiroiditis de Hashimoto fue demostrada por primera vez en 1956 por Roitt y cols⁴, que utilizaron la precipitación por difusión de gel.

Los autoanticuerpos anti-Tg son, predominantemente, del tipo IgG⁵. Se detectan, con frecuencia con autoanticuerpos TPO, en la mayoría de los casos de la enfermedad de Graves y de la enfermedad de Hashimoto, incluidas otras variantes de hipotiroidismo primario crónico, por ejemplo, mixoedema y tiroiditis asintomática. También se han detectado en la tiroiditis indolora post-parto o espontánea⁶, en los trastornos autoinmunes tiroideos con artritis reumatoidea^{7,8}, y en enfermedades autoinmunes no tiroideas, por ejemplo, la enfermedad de Addison y la diabetes mellitus Tipo 1⁸. Dependiendo de la metodología y del valor límite del análisis, también se detectan en el 1,3% al 14,6%^{8,9} de personas asintomáticas aparentemente sanas. El papel de los autoanticuerpos Tg circulantes no está claro; pueden ser, sencillamente, indicadores de enfermedad ya que, a diferencia de los autoanticuerpos TPO, no parecen ser patogénicos.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con antígeno Tg humano purificado. Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos en plasma o suero diluido se fijan a la superficie recubierta con el antígeno. A continuación, se lavan los vasos para eliminar los componentes no fijados. En la segunda incubación, el Conjugado, anticuerpos marcados con enzima a IgG humanos, se fija a cualquier autoanticuerpo fijado a la superficie. Después de otro lavado, se determinan los autoanticuerpos específicos mediante la incubación con el Substrato. El añadido de la Solución de Parada finaliza la reacción, produciendo un producto final coloreado. La cantidad de Conjugado fijado se mide en unidades de absorbencia. En el protocolo cualitativo, la cantidad de Conjugado fijado por la muestra se compara con la fijada por el Control de Referencia. En el protocolo cuantitativo, la concentración de autoanticuerpo anti-Tg puede calcularse por interpolación a partir de una curva dosis-respuesta basada en los Estándares. Los Estándares se referencian en comparación con la Preparación de Referencia Internacional de la anti-tiroglobulina 65/93.

COMPONENTES DEL KIT

A	Conjugado 1 IgG	1 x 15mL	Anticuerpos marcados con fosfatasa alcalina a IgG humana, búfer Tris, estabilizador de proteínas, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
B	Sustrato	1 x 15mL	Mg ²⁺ , monofosfato de fenolftaleína (PMP), solución de búfer. Listo para su uso. No exponer a la luz durante el almacenamiento.	
C	Solución de Parada	1 x 15mL	Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). Listo para su uso.	
D	Concentrado de Búfer de Lavado (16X)	3 x 25mL	Búfer boratado, 0,4% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
E	Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg	12 x 8 bandas de microtitulación de vasos	Recubierto con antígeno Tg, en un paquete metalizado y resellable, con desecante. Código de colores AZUL COBALTO . Los vasos individuales pueden separarse de cada banda de microtitulación.	
F	Concentrado de Diluyente de Muestra (5X)	1 x 25mL	Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
1-5	Estándares Anti-Tg	5 x 1,0mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. 0, 100, 400, 1500, 5000 IU/mL. Listo para su uso.	
6	Control de Referencia Anti-Tg	1 x 1,5mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
+/-	Control Positivo Control Negativo	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Plasma humano, <0,1% (c/v) azida sódica. Diluir 1:101 con Diluyente de Muestra diluido antes de su uso, por lo que respecta a las muestras.	
	Folleto del Paquete			

ALMACENAMIENTO DE REACTIVOS

Estabilidad del Kit Una Vez Abierto

Un kit fue abierto y reutilizado en tres ocasiones durante un período de tres meses sin efectos adversos sobre la eficacia del mismo.

Notas sobre la Manipulación y los Procedimientos

1. Guardar los componentes del kit a 2-8° C y utilizar hasta la fecha de caducidad que aparece en las etiquetas. No utilizar reactivos caducados.
2. No mezclar números de lote diferentes.
3. No congelar los kits.
4. El Concentrado de Búfer de Lavado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y los Controles Positivos y Negativos deben diluirse antes de su utilización. Todo el resto de reactivos están listos para ser usados.
5. El Búfer de Lavado diluido y el Diluyente de Muestra diluido son estables a 2-8° C durante 6 meses si se evita la contaminación microbiana.
6. Volver a colocar las bandas de microtitulación sobrantes en el paquete metálico y guardar con el producto desecante a 2-8° C hasta su reutilización.
7. El soporte para placas está adaptado para ser utilizado únicamente con vasos encajables.
8. No exponer el Substrato a la luz durante el almacenamiento.
9. Evitar la contaminación de reactivos. Utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada manipulación de muestra o reactivo.

Signos de Deterioro

El Substrato debe tener un color amarillo pálido. El color rosa indica contaminación y hay que desechar el reactivo. La turbiedad o precipitación en cualquier componente indica deterioro y hay que desechar el componente.

Recogida y Almacenamiento de Muestras

El análisis está recomendado para muestras de suero/EDTA, plasma citrado o Li-Heparina; no utilizar muestras turbias, hemolizadas ni lipémicas. Mezclar minuciosamente las muestras descongeladas antes del análisis y no volver a congelar/descongelar. No calentar las muestras inactivadas, ya que esto podría producir resultados falsos positivos.

Se pueden guardar las muestras no diluidas o diluidas 1:101 en Diluyente de muestra diluido a -20° C ó 2-8° C durante dos semanas.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**Únicamente para uso diagnóstico *in vitro*.****Precauciones de Seguridad**

1. Siga estrictamente las instrucciones de este folleto, especialmente las relativas a la manipulación y las condiciones de almacenamiento.
2. Los Estándares y los controles contienen plasma humano al que se han realizado pruebas con análisis aprobados por la FDA para antígeno de superficie de la hepatitis B, VHC, antígeno VIH y anticuerpos VIH y cuyos resultados han sido no reactivos/negativos. Ya que ninguna prueba conocida ofrece una garantía total de que no estén presentes agentes infecciosos, hay que considerar los Estándares y los Controles como potencialmente infecciosos y manipularlos con las mismas precauciones que cualquier otro material potencialmente biopeligroso. El Manual de Salud CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3ª edición, 1993, describe el modo en que se deben manipular estos materiales de acuerdo con una Buena Práctica de Laboratorio. Esto es aplicable en los EE.UU.
3. No pipetar con la boca.
4. No fumar, comer, beber ni aplicar cosméticos en áreas en las que se manipulan kits y muestras.
5. Hay que proteger adecuadamente todas las heridas, cortes y abrasiones de la piel así como otras lesiones dermatológicas.
6. Los Estándares, los Controles, el Conjugado, el Concentrado de Diluyente de Muestra y el Concentrado de Búfer de Lavado contienen azida sódica que puede reaccionar con las tuberías de plomo y cobre y formar azidas metálicas extremadamente explosivas. Para su eliminación, verter con grandes cantidades de agua con el fin de prevenir la formación de azida.
7. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. La Solución de Parada contiene hidróxido de sodio. Evite el contacto con la piel, los ojos y las membranas mucosas. Si se produce contacto con piel u ojos, lavar con agua y acudir inmediatamente a un médico.
8. El sustrato contiene PMP, Bronidox L, y Dietanolamina. Evite el contacto con la piel, los ojos y mucosas. Si se produce contacto con la piel, los ojos o mucosas, aclárelos con agua y consulte con su médico.
9. Pueden solicitarse a Euro Diagnostica las hojas de datos de seguridad del material para todos los componentes peligrosos contenidos en este kit.

**B.**

SUBS

Atención

Contiene: Dietanolamina

H319:	Provoca irritación ocular grave.
P264:	Lávese bien las manos después de manipular.
P280:	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P305+P351+P338:	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P337+P313:	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



C.

SOLN	STOP
------	------

Atención

Contiene: Hidróxido de sodio

- H315: Provoca irritación cutánea.
 H319: Provoca irritación ocular grave.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P302+P352: EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes.
 P305+P351+P338: EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
 P332+P313: En caso de irritación cutánea: Consultar a un médico.
 P337+P313: Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Atención

Contiene: Azida sódica

- H302: Nocivo en caso de ingestión.
 EUH032: En contacto con ácidos libera gases muy tóxicos.
 H412: Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.
 P264: Lávese bien las manos después de manipular.
 P280: Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
 P301+P312: EN CASO DE INGESTIÓN: Llamar a un CENTRO DE INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA o a.
 P273: Evitar su liberación al medio ambiente.

PREPARACIÓN

Materiales/Equipos Necesarios No Suministrados

1. Lector de banda/placa de vasos 96 con filtro 550 nm (es aceptable 540-565 nm).
2. Pipetas de precisión para dispensar 10 µL, 100 µL, 1 mL. Pipeta automática para dispensar 100 µL. Pipeta automática para dispensar 200 µL para el lavado manual, lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Recipientes con volumen 1 mL.
5. Agua destilada/desionizada.
6. Toallitas de papel.
7. Cronómetro para intervalos de 30 y 60 minutos.

Preparativos para el Análisis

Dejar que todos los componentes del kit, incluidas las bandas de microtitulación, se templen a 18-25° C durante 30-60 minutos antes de su utilización. Mezclar los reactivos mediante una suave inversión.

No diluir el Control de Referencia.

Diluir los siguientes reactivos y mezclar minuciosamente.

Reactivo	Volumen	Añadir
Concentrado de Búfer de Lavado	1 vial	375 mL de agua destilada/desionizada
Concentrado de Diluyente de Muestra	1 vial	100 mL de agua destilada/desionizada
Muestras/Controles Positivos y Negativos	10 µL	1mL de Diluyente de Muestra diluido

Los vasos de microtitulación se suministran en bandas de ocho unidades. Si resulta necesario un número de vasos no múltiplo de ocho, proceda del siguiente modo.

1. Extraiga la banda del soporte presionando el fondo de los vasos.
2. Desencaje el número necesario de vasos.
3. Encaje el orificio rectangular en el borde inferior (a H) de la ranura del soporte.
4. Compruebe que el orificio cuadrado, con la muesca a la izquierda, está firmemente sujeto en todo el borde superior (fila A).

P R O T O C O L O D E L A N Á L I S I S

Protocolo cualitativo: realizar el Control de Referencia, los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

Protocolo cuantitativo: realizar los Estándares (1-5), los Controles Positivos y Negativos y las muestras.

1. Vasos de referencia para identificación.
2. Pipetar 100µL de Estándares/Control de Referencia por duplicado, Controles Positivos y Negativos prediluidos y muestras de pacientes prediluidas en los vasos correspondientes. No olvide cambiar las puntas de las pipetas entre añadidos. Esta fase no debe durar más de 15 minutos para ningún conjunto de Estándares/Controles/muestras.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° C.
4. Decantar el contenido de la banda mediante inversión rápida sobre un lavabo adecuado para la eliminación de materiales biológicos, teniendo presente el potencial riesgo infeccioso de las muestras. Secar los vasos de las bandas invertidas con toallitas de papel.
5. Lavar los vasos **cinco veces** con un mínimo de 200µL de Búfer de Lavado diluido. **Decantar y secar después de cada fase de lavado.**
6. Añadir 100µL de Conjugado 1 IgG a cada vaso.
7. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C.
8. Repetir los pasos 4 y 5.
9. Añadir 100 µL de Substrato a cada vaso.
10. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° C. **No decantar.**
11. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso, en el mismo orden y ritmo que el Substrato. Agitar los vasos con suavidad para mezclar.
12. Leer las bandas a las 24 horas a 550 nm (540-565 nm).

CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Considerar cada análisis de forma independiente a la hora de calcular e interpretar los resultados.

Protocolo Cualitativo

Calcular el valor de la tasa de absorbencia (densidad óptica) para los controles Positivos y Negativos así como para cada muestra.

$$\text{Tasa de Absorbencia} = \frac{\text{Muestra} \circ \text{Valor de Absorbencia del Control}}{\text{Valor de Absorbencia del Control de Referencia promedio}}$$

Los usuarios deben calcular un límite entre las muestras positivas y negativas que sea específico para sus poblaciones de pacientes. Los resultados de las poblaciones de pacientes utilizadas en la prueba clínica Euro Diagnostica sugieren el siguiente límite:

<u>Tasa de Absorbencia</u>	<u>Interpretación de los Resultados</u>
<0,95	Negativo
≥0,95 a ≤1,0	Límite – se recomienda repetir la prueba
>1,0	Positivo

Protocolo Cuantitativo

Calcular el valor promedio de absorbencia de cada Estándar y realizar un gráfico de comparación con la concentración Estándar log₁₀ (véase la siguiente tabla) en un papel cuadrulado adecuado.

Posteriormente, pueden leerse las concentraciones de los controles y las muestras a partir de la curva estándar; a continuación aparece como referencia un gráfico típico; no debe utilizarse para interpretar los resultados. También son satisfactorios la logística de 4 parámetros (4PL) y la curva uniforme o de logaritmo/logit.

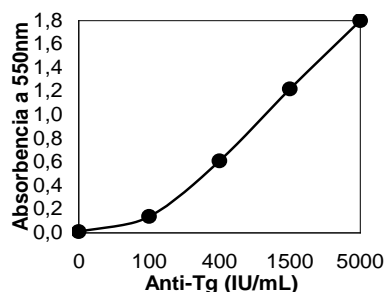
Las muestras con absorbencias superiores al Estándar 5 (5000 IU/mL) quedan fuera del rango del análisis y deben señalarse como corrección del factor de dilución >5000 IU/mL, diluido y nuevamente analizado.

NOTA: Como en todos los análisis que miden anticuerpos, este análisis determina la actividad del anticuerpo presente en la muestra, no su concentración. La actividad puede verse afectada por cierto número de parámetros, por ejemplo, la avidéz de los anticuerpos.

Concentraciones de los Estándares

Número de Estándar	Concentración IU/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Curva de Estándares Típica



CONTROL DE CALIDAD

Comprobar que se lleva a cabo un mantenimiento y una calibración de lector de placa apropiados de acuerdo con las instrucciones del fabricante y que se utiliza la longitud de onda correcta.

Los usuarios deben garantizar que están totalmente familiarizados con las instrucciones para la realización del análisis, especialmente la sección de Advertencias y Precauciones y las Notas sobre Manipulación y Procedimientos.

Los usuarios deben demostrar que pueden obtener especificaciones de rendimiento precisas y una gama comunicable de resultados de la prueba comparables a los determinados por el fabricante antes de comunicar resultados de pruebas en pacientes. Se recomienda realizar los Controles Positivos y Negativos prediluidos por duplicado en todos los análisis con el fin de monitorizar la calidad del procedimiento de la prueba. Realizar el Control de Referencia listo para su uso por duplicado en todos los análisis Cualitativos.

Suponiendo que se cumplen las especificaciones de precisión descritas por el fabricante, si alguno de los Controles no cumple las especificaciones de tasa de Control que aparecen a continuación, esto anula el análisis y no deben proporcionarse los datos de este paciente. El operario puede repetir el análisis, tras haber revisado el procedimiento, o ponerse en contacto con el distribuidor/fabricante. Para repetir el análisis, prepare una dilución nueva de cada Control y muestra. Los laboratorios pueden querer incluir controles internos en cada realización del análisis. Guardar dicho material de control a o por debajo de -20° C y evitar repetir los ciclos de congelación/descongelación. Los conservantes tales como la azida sódica a 0,1 % (c/v) no afectarán a los resultados de la muestra. Los niveles analíticos identificados en determinadas enfermedades son los establecidos por el fabricante para poblaciones específicas y no reflejan necesariamente la literatura. Los niveles de incidencia, su relación con enfermedades específicas, los rangos de referencia y los valores límite apropiados deben calcularse para las poblaciones específicas atendidas por los usuarios.

Especificaciones de Tasa de Control

Protocolo	Especificaciones
Cualitativo (proporciones)	$\frac{\text{Absorbencia de Control Positivo}}{\text{Absorbencia de Control de Referencia}}$ Véase etiqueta de Control Positivo
	$\frac{\text{Absorbencia de Control Negativo}}{\text{Absorbencia de Control de Referencia}}$ <0,95
Cuantitativo	Véase etiqueta de Control Positivo para el rango previsto aceptable (IU/mL)
	Concentración de Control Negativo <100 IU/mL

VALORES PREVISTOS

A 207 muestras de suero de donantes asintomáticos aparentemente sanos, que abarcaban una proporción aproximadamente similar de hombres y de mujeres, con edades comprendidas entre los 17 y los 68 años y sin historia de enfermedad autoinmune, se les realizó un análisis de anticuerpos anti-Tg del tipo IgG. Tres muestras dieron un resultado de 582, 997 y 1396 IU/mL y fueron excluidas de los cálculos del límite. Utilizando el valor promedio de 204 muestras más 2,5 desviaciones estándar, se determinó el rango de referencia con un límite de 100 IU/mL. 195/204 (95,6%) de esta población obtuvo un valor inferior a 100 IU/mL. A continuación se detalla la distribución del 4,4% que obtuvo un valor superior a 100 IU/mL.

Rango de la Referencia
 ≤ 100 IU/mL = Negativo
 > 100 IU/mL = Positivo

Nº.	Anti-Tg IU/mL	% Población Asintomática (n=204)
6	100-119,9	2,9
-	120-139,9	-
2	140-159,9	0,97
1	160-179,9	0,48

Utilizando este rango de referencia, se obtuvo la distribución de los autoanticuerpos en 116 muestras de pacientes con enfermedad tiroidea. La información diagnóstica se basa en el diagnóstico supuesto proporcionado por los laboratorios que suministraron las muestras. También se incluyen los pacientes con un resultado positivo para la viremia de Paul Bunnel. En la siguiente tabla aparece la distribución de los resultados.

Diagnóstico Supuesto	n	Rango (IU/mL)			
		0 – 100	>100–1000	>1000–5000	>5000
Graves/Tirotoxicosis	59	35	19	5	-
Hipotiroidismo	24	11	10	3	-
Enfermedad de Hashimoto/Tiroiditis/ Enfermedad Tiroidea Autoinmune	33	25	8	-	-
Positivo para Viremia de Paul Bunnel	31	30	1	-	-

DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO

Concordancia con el Análisis de la Aglutinación Anti-Tg

Se llevó a cabo un estudio comparativo con una prueba de aglutinación anti-Tg disponible comercialmente, utilizando 299 muestras de pacientes. 28 muestras obtuvieron un resultado límite en el análisis de aglutinación; éstas fueron excluidas de la concordancia global. Se obtuvieron los siguientes resultados:

AGLUTINACIÓN ANTI-Tg	DIASTAT®	
	+ve	-ve
+ve	53	5*
-ve	12≅	201

Concordancia global = 93,7%. A las muestras 5* y 12≅ discrepantes se les realizó una prueba con dos ELISAs anti-TG comercialmente disponibles. Las 5* dieron un resultado negativo en estos dos ELISAs; de las 12≅, diez dieron un resultado positivo en un ELISA y cuatro dieron un resultado positivo en el segundo ELISA.

Concordancia con el Análisis ELISA Anti-TG

Se llevó a cabo un estudio comparativo con otro ELISA anti-Tg, utilizando 169 muestras de pacientes. Se obtuvieron los siguientes resultados:

ELISA ANTI-Tg	DIASTAT®	
	+ve	-ve
+ve	79	6
-ve	1	83

Concordancia global = 95,9%. Se realizó una prueba a las siete muestras discrepantes con otro kit ELISA. El resultado DIASTAT fue confirmado en 6/7 (85,7%).

Características de la dilución

Se analizaron cuatro diluciones de dos muestras de pacientes utilizando dos lotes de kits. La siguiente tabla muestra los valores promedio obtenidos y la recuperación con dilución corregida.

Muestra	Dilución	Valor Promedio IU/mL	Porcentaje de Recuperación %
1	A	1564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Imprecisión

1. **Imprecisión en el análisis**, determinada mediante la prueba de cuatro controles en 12 análisis, utilizando tres operadores y tres lotes de kits, con replicación de cuatro.

Control	Valor Promedio IU/mL	Raíz Cuadrada Promedio %CV
1	195	5,3
2	609	7,8
3	752	6,4
4	1755	10,5

2. **Imprecisión entre análisis**, determinada mediante la prueba de cuatro controles en 12 análisis, utilizando tres operadores y tres lotes de kits, con replicación de cuatro.

Control	Valor Promedio IU/mL	SD	%CV
1	195	20,7	10,6
2	609	54,2	8,9
3	752	59,4	7,9
4	1755	254,5	14,5

LIMITACIONES DE USO

- Aunque la presencia de títulos elevados de anticuerpos a la tiroglobulina es indicativa de enfermedad tiroidea autoinmune, hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
- Algunas personas pueden presentar niveles elevados de anticuerpos anti-Tg con escasas o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, algunos pacientes con enfermedad tiroidea autoinmune pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos.
- Se pueden hallar títulos bajos de anti-Tg en personas aparentemente sanas. El significado clínico de esta información es, en la actualidad, poco claro.
- Para una repetición de la toma de muestras del paciente, por ejemplo, para monitorización, se debe utilizar el mismo tipo de muestra (suero o EDTA, plasma citrado o Li-Heparina) durante todo el período del estudio.

REFERENCIAS

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluir muestras y Controles Positivos y Negativos 1:101. No diluir Estándares ni Control de Referencia.
2. Añadir 100µL de Estándares/Control de Referencia por duplicado, muestras y Controles Positivos y Negativos prediluidos en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
4. Lavar las bandas 5 veces.
5. Añadir 100µL de Conjugado 1 IgG a cada vaso.
6. Incubar 30 ± 5 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
7. Lavar las bandas 5 veces.
8. Añadir 100µL de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a $18-25^{\circ}$ C.
10. Añadir 100 µL de Solución de Parada a cada vaso.
11. Leer la absorbencia a 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Etalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoin de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

DEUTSCH: ANWENDUNGSGEBIETE

Der DIASTAT[®] Anti-Thyroglobulin (Anti-Tg)-Test ist ein quantitativer/qualitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) zum Nachweis von Autoantikörpern, die spezifisch für Thyroglobulin in Humanserum oder in EDTA-, Li-Heparin- oder zitriertem Plasma sind. Der Test ist zur Unterstützung der Diagnose von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen bestimmt und ist isoliert betrachtet nicht maßgebend. Die Autoantikörperspiegel stellen jedoch nur einen Parameter in einem sich aus vielen Kriterien zusammensetzenden diagnostischen Prozess dar.

EINLEITUNG





Thyroglobulin (Tg), Jodidperoxidase (TPO) und der TSH-Rezeptor werden als die wichtigsten Autoantigene im Zusammenhang mit der chronischen autoimmunen Thyroiditis angesehen. Die klinische Diagnose stützt sich in der Regel auf die Anwesenheit von Autoantikörpern gegen Tg und TPO im Serum oder Plasma¹. Bei der Basedow-Krankheit (chronische primäre Hyperthyreose) ist der TSH-Rezeptor das Antigen, das am direktesten an den klinischen Manifestationen der Krankheit beteiligt ist². Thyroglobulin, ein wasserlösliches Glycoprotein (660kD), ist der Vorläufer der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin. Das Auftreten von Anti-Tg-Autoantikörpern bei Patienten mit Hashimoto-Thyroiditis wurde erstmals 1956 von Roitt et al⁴ unter Verwendung der Geldiffusions- präzipitation nachgewiesen.

Anti-Tg-Autoantikörper gehören meist der IgG-Klasse an⁵. Sie sind, häufig zusammen mit TPO-Autoantikörpern, bei den meisten Fällen von Basedow-Krankheit und Hashimoto-Thyroiditis, einschließlich anderer Varianten des chronischen primären Hypothyreose, wie z.B. Myxödem und asymptomatische Thyroiditis, nachzuweisen. Sie wurden auch bei der schmerzlosen spontanen oder postpartalen Thyroiditis⁶, bei Schilddrüsenautoimmunität in Verbindung mit rheumatoider Arthritis^{7,8} und bei nicht die Schilddrüse betreffenden Autoimmunerkrankungen, wie z.B. die Addison-Krankheit und Diabetes mellitus vom Typ 1⁸ nachgewiesen. Je nach Methode und Cutoff-Punkt des Tests sind sie auch bei 1,3% bis 14,6%^{8,9} der augenscheinlich gesunden asymptomatischen Patienten nachzuweisen. Die Rolle der zirkulierenden Tg-Autoantikörper ist noch unklar; sie sind möglicherweise lediglich Indikatoren für eine Krankheit, da sie im Gegensatz zu TPO-Autoantikörpern nicht pathogen zu sein scheinen.

TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit gereinigtem humanen Tg-Antigen beschichtet. Während der ersten Inkubation binden sich in verdünntem Serum oder Plasma vorliegende spezifische Autoantikörper an die mit Antigen beschichtete Oberfläche. Die Vertiefungen werden dann zur Entfernung ungebundener Komponenten gewaschen. Bei der zweiten Inkubation heftet sich das Konjugat, ein gegen humanes IgG gerichteter Enzym-markierter Antikörper, an alle Oberflächen- gebundenen Autoantikörper an. Nach weiterem Waschen werden spezifische Autoantikörper durch Inkubation mit dem Substrat nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Stopplösung unterbrochen und führt zu einem farbigen Endprodukt. Die Menge des gebundenen Konjugates wird in Extinktionseinheiten gemessen. Im qualitativen Protokoll wird die von der Probe gebundene Konjugatmenge mit der von der Referenzkontrolle gebundenen Konjugatmenge verglichen. Im quantitativen Protokoll kann die Anti-Tg-Autoantikörper-Konzentration durch Interpolation einer auf die Standards bezogenen Dosis-Wirkungskurve bestimmt werden. Die Standards werden mit dem internationalen Referenzpräparat von Anti-Thyroglobulin 65/93 verglichen.

TESTKIT-REAGENZIEN

A	IgG-Konjugat 1	1 x 15 mL	Mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen Human-IgG, Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , Phenolphthaleinmonophosphat (PMP), Pufferlösung. Gebrauchsfertig. Lichtgeschützt lagern.	
C	Stopplösung	1 x 15 mL	Natriumhydroxid, EDTA, Carbonatpuffer (pH >10). Gebrauchsfertig.	
D	Waschpufferkonzentrat (16X)	3 x 25 mL	Boratpuffer, 0,4% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
E	Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 x 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen	Beschichtet mit Tg-Antigen, in einer wieder verschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel. Farbkodierung: KÖNIGSBLAU . Von jedem Mikrotiterstreifen können einzelne Vertiefungen abgebrochen werden.	
F	Probendiluens-Konzentrat (5X)	1 x 25 mL	Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 0,5% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
1-5	Anti-Tg Standards	5 x 1.0 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 100, 400, 1500, 5000 IU/mL. Ready-to-use.	
6	Anti-Tg-Referenzkontrolle	1 x 1.5 mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. Gebrauchsfertig.	
+/-	Positiv Kontrolle Negativ Kontrolle	1 x 0.2 mL 1 x 0.1 mL	Humanplasma, <0,1% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch: Verdünnung 1:101 mit verdünntem Probendiluens, wie für die Proben.	
	Packungsbeilage			

LAGERUNG DER REAGENZIEN

Haltbarkeit des geöffneten Testkits

Ein Testkit wurde geöffnet und während einer dreimonatigen Periode dreimalig ohne nachteilige Wirkung auf die Kitleistung wieder verwendet.

Handhabungs- und Verfahrenshinweise

1. Die Testkit-Bestandteile bei 2-8° C lagern und bis zu dem auf den Etiketten angegebenen Verfalldatum verwenden. Reagenzien nicht über das Verfalldatum hinaus verwenden.
2. Reagenzien aus verschiedenen Testkit-Chargen dürfen nicht miteinander gemischt werden.
3. Testkits nicht einfrieren.
4. Waschpuffer-Konzentrat, Probendiluens-Konzentrat und Positiv- und Negativ-Kontrollen müssen vor Gebrauch verdünnt werden. Alle anderen Reagenzien sind gebrauchsfertig.
5. Verdünnter Waschpuffer und verdünntes Probendiluens sind bei 2-8° C bis zu 6 Monaten beständig, wenn eine mikrobielle Kontamination vermieden wird.
6. Überzählige Mikrotiterstreifen in die Folienpackung zurückgeben mit dem Trockenmittel bis zum Gebrauch bei 2-8° C lagern.
7. Das Plattengestell ist nur zum Gebrauch mit einschnappbaren Vertiefungen geeignet.
8. Das Substrat während der Lagerung nicht der Lichteinwirkung aussetzen.
9. Die Kontamination der Reagenzien vermeiden. Für jedes Reagenz oder Probe eine neue Einmalpipettenspitze verwenden.

Anzeichen einer Wertminderung

Das Substrat soll hellgelb aussehen. Eine Rosafärbung ist ein Anzeichen für eine Kontamination, und das Reagenz muss verworfen werden. Trübung oder Niederschlag in einem Bestandteil sind Anzeichen einer Wertminderung, und der Bestandteil muss verworfen werden.

Probensammlung und Aufbewahrung

Der Test wird für Serum-/EDTA-, Li-Heparin- oder zitrierte Plasmaproben empfohlen; lipämische, hämolysierte oder trübe Proben dürfen nicht verwendet werden. Aufgetaute Proben vor dem Test gründlich mischen, und erneutes Einfrieren/Auftauen vermeiden. Proben nicht durch Erhitzen inaktivieren, da dies zu falsch-positiven Ergebnissen führen kann.

Die Proben können zwei Wochen unverdünnt oder in einer Verdünnung von 1:101 in verdünntem Probendiluens bei -20° C oder 2-8° C aufbewahrt werden.

WARNHINWEISE UND VORSICHTSMASSNAHMEN

Nur für die Anwendung als In-vitro-Diagnostikum.

Vorsichtsmaßnahmen

1. Die Anleitungen in dieser Broschüre, besonders die Handhabungs- und Lagerungsvorschriften, strikt befolgen.
2. Standards und Kontrollen enthalten menschliches Plasma und wurden gemäß den geltenden FDA-Richtlinien auf Hepatitis-B-Surface-Antigen, HCV, HIV-Antigen und HIVAntikörper getestet und als nicht reaktiv/negativ befunden. Da keine bekannte Testmethode die absolute Gewähr bieten kann, dass Produkte aus menschlichem Blut pathogenfrei sind, müssen alle Standards und Kontrollen als potentiell infektiös angesehen und unter Beachtung der gleichen Sicherheitsrichtlinien wie andere potentiell gefährliche biologische Materialien behandelt werden. Das CDC/NIH-Gesundheitshandbuch "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", Auflage, 1993, beschreibt wie diese Materialien unter Beachtung der Good Laboratory Practice (GLP) zu handhaben sind. Dies trifft in den USA zu.
3. Nicht mit dem Mund pipettieren.
4. In Bereichen, in denen Testkits und Proben gehandhabt werden, nicht rauchen, essen, trinken und keine Kosmetika anwenden.
5. Alle erkrankten Hautareale, Schnitte, Abschürfungen und weitere Hautläsionen ausreichend schützen.
6. Standards, Kontrollen, Konjugat, Probendiluens-Konzentrat und Waschpuffer-Konzentrat enthalten Natriumazid, das mit Blei- und Kupferrohren unter Bildung hoch explosiver Metallazide reagieren kann. Zur Vermeidung einer Azidansammlung bei der Entsorgung mit reichlich Wasser wegspülen.
7. Die Stopplösung enthält Natriumhydroxid. Den Kontakt mit Haut, Augen und Schleimhäuten vermeiden. Verschüttetes Natriumhydroxid muss mit reichlich Wasser aufgewischt werden. Wenn Berührung mit Augen oder Haut auftritt, mit Wasser abspülen und sofort den Arzt konsultieren.
8. Das Substrat enthält PMP, Bronidox L und Dietanolamin. Kontakt mit Haut, Augen und Atemwege vermeiden. Bei Kontakt mit Haut, Augen oder Atemwege mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
9. Sicherheitsdatenblätter für alle in diesem Testkit enthaltenen gefährlichen Bestandteile sind auf Anfrage von Euro Diagnostica erhältlich.



B.

SUBS

Achtung

Enthält: Dietanolamin

- H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



C.

SOLN	STOP
------	------

Achtung

Enthält: Natriumhydroxid

- H315: Verursacht Hautreizungen.
 H319: Verursacht schwere Augenreizung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P302+P352: BEI HAUT KONTAKT: Mit sehr viel Seife und Wasser waschen.
 P305+P351+P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.
 P332+P313: Im Falle einer Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.
 P337+P313: Im Falle einer anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/einen Arzt aufsuchen.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Achtung

Enthält: Natriumazid

- H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.
 EUH032: Kontakt mit Säure setzt sehr giftige Gase frei.
 H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit lang anhaltender Wirkung.
 P264: Nach Gebrauch die Hände gründlich waschen.
 P280: Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz verwenden.
 P301+P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.
 P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

VORBEREITUNG

Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien/Geräte

1. Lesegerät mit 550 nm Filter (540-565 nm ist zulässig) für eine Platte/einen Streifen mit 96 Vertiefungen.
2. Präzisionspipetten zum Pipettieren von 10 µL, 100 µL und 1mL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 100 µL. Automatische Pipette zum Pipettieren von 200 µL zum manuellen Waschen, wahlweise mit einem automatischen Plattenwäscher.
3. Glas-/Kunststoffmesszylinder: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Gefäße zur Aufnahme eines 1mL Volumens
5. Destilliertes/deionisiertes Wasser.
6. Papiertücher.
7. Stoppuhr für 30 und 60 Minuten Intervalle.

Vorbereitung zur Testdurchführung

Alle Testkit-Bestandteile, einschließlich der Mikrotiterstreifen, vor Gebrauch 30-60 Minuten auf bis zu 18-25° C anwärmen. Die Reagenzien durch vorsichtiges Schwenken mischen.

Die Referenzkontrolle nicht verdünnen.

Die folgenden Reagenzien verdünnen und gründlich mischen.

Reagenz	Volumen	Zugabe
Waschpufferkonzentrat	1 Flasche	375 mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Probendiluenskonzentrat	1 Flasche	100 mL destilliertes/deionisiertes Wasser
Positiv- und Negativ-Kontrollen/Proben	10µL	1 mL verdünntes Probendiluens

Die Mikrotitervertiefungen kommen in Streifen mit je acht Vertiefungen. Wenn eine andere Einheit als ein Vielfaches von acht benötigt wird, wie folgt vorgehen:

1. Den Streifen durch Drücken auf der Unterseite der Vertiefungen aus dem Rahmen nehmen.
2. Die benötigte Anzahl von Vertiefungen abrechnen.
3. Das rechteckige Loch in die untere Kante (zu H) der Kerbe am Rahmen einhängen.
4. Sicherstellen, dass das Vierkantloch mit Einkerbung auf der linken Seite entlang der oberen Kante sicher festgehalten wird (Reihe A).

TESTPROTOKOLL

Qualitatives Protokoll: Referenzkontrolle, Positiv- und Negativkontrollen und Proben testen.

Quantitatives Protokoll: Standards (1-5), Positiv- und Negativ-Kontrolle und Proben testen.

1. Referenzvertiefungen zum Nachweis.
2. 100µL Referenzkontrolle/Standards (Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativ-Kontrollen und vorverdünnte Patientenproben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren. Bitte denken Sie daran, zwischen den Zugaben die Pipettenspitzen zu wechseln. Dieser Schritt darf für die jeweilige Standard-/Kontroll-/Probenreihe nicht länger als 15 Minuten dauern.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Den Streifeninhalt durch schnelles Umkehren über einem für die Entsorgung biologischer Materialien geeigneten Spülbecken dekantieren, wobei die potentielle Infektionsgefahr der Proben zu berücksichtigen ist. Die umgekehrten Streifen gründlich mit Papiertüchern abtupfen.
5. Die Vertiefungen **fünfmal mit mindestens 200µL** verdünntem Waschpuffer waschen.
Dekantieren und nach jedem Waschschrift abtupfen.
6. In jede Vertiefung 100 µL IgG-Konjugat geben.
7. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
8. Schritte 4 und 5 wiederholen.
9. In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben.
10. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren. **Nicht dekantieren.**

11. In der gleichen Reihenfolge und Rate wie für das Substrat in jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben. Die Vertiefungen durch vorsichtiges Beklopfen mischen.
12. Die Streifen innerhalb von 24 Stunden bei 550nm (540-565nm) ablesen.

BERECHNUNG UND INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Bei der Berechnung und Interpretation der Ergebnisse jeden Test getrennt auswerten.

Qualitatives Protokoll

Das Verhältnis des Extinktionswertes (optische Dichte) für die Positiv- und Negativ-Kontrollen und für jede Probe berechnen.

$$\text{Extinktionsverhältnis} = \frac{\text{Extinktionswert der Probe **oder** Kontrolle}}{\text{Mittelwert der Extinktion der Referenzkontrolle}}$$

Die Anwender müssen einen für ihre Patientenpopulationen spezifischen Cut-off-Wert zwischen positiven und negativen Proben berechnen. Die Ergebnisse von den Patientenpopulationen, die an der von Euro Diagnostica durchgeführten klinischen Prüfung teilnahmen, deuten auf den folgenden Cut-off-Wert hin:

<u>Extinktionsverhältnis</u>	<u>Interpretation der Ergebnisse</u>
<0.95	Negative
≥0.95 bis ≤1.0	Borderline – Testwiederholung empfohlen
>1.0	Positiv

Quantitatives Protokoll

Der durchschnittliche Extinktionswert jedes Standards wird gegen eine log₁₀- Standardkonzentration (siehe nachfolgende Tabelle) auf geeignetem Diagrammpapier aufgezeichnet. Die Konzentration von Proben und Kontrollen kann dann von der Standardkurve abgelesen werden; eine typische Kurve wird für Referenzzwecke nachstehend gezeigt, sie darf jedoch nicht für die Interpretation der Ergebnisse eingesetzt werden. 4 Parameter umfassende angepaßte logistische (4PL), log/logit- oder Spline-Kurven sind ebenfalls ausreichend.

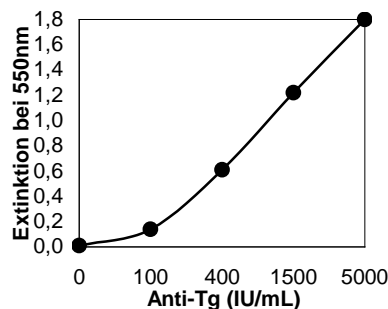
Proben mit Absorbanzen über Standard 5 (5000 IU/mL) liegen außerhalb des Assaybereichs und werden als >5000 IU/mL angegeben, verdünnt und nochmals getestet und um diesen weiteren Verdünnungsfaktor berichtigt.

Bitte beachten: Wie jeder Assay zum Nachweis von Antikörpern bestimmt auch dieser Assay die Aktivität der in der Probe vorkommenden Antikörper und nicht deren Konzentration. Die Aktivität kann von einer Reihe verschiedener Parameter beeinflusst werden, wie zum Beispiel der Antikörper-Avidität.

Standardkonzentrationen

Standard-nummer	Konzentration IU/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Typische Standardkurve



QUALITÄTSKONTROLLE

Darauf achten, dass eine angemessene Instandhaltung und Kalibrierung des Plattenlesegerätes nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt und die richtige Wellenlänge angewendet wird. Die Laboratorien sollten sicherstellen, dass das Personal mit der Testanleitung, besonders aber den Abschnitten zu den Warnungs- und Vorsichtsmaßnahmen sowie den Handhabungs- und Verfahrenshinweisen vollkommen vertraut ist.

Das Personal muss darüber hinaus den Nachweis erbringen, dass es vor der Herausgabe der Patientenergebnisse Leistungsspezifikationen in Bezug auf die Präzision und den zu berichtenden Bereich der Testergebnisse erheben kann, die mit den von dem Hersteller vorgegebenen vergleichbar sind. Zur Überwachung der Qualität des Testverfahrens wird empfohlen, dass die vorverdünnten Positiv- und Negativ-Kontrollen in allen Tests als Doppelbestimmung mitlaufen. Bei allen qualitativen Tests muss die gebrauchsfertige Referenzkontrolle als Doppelbestimmung mitlaufen.

Vorausgesetzt, daß die vom Hersteller beschriebenen Präzisionsspezifikationen erfüllt werden, ist der Test ungültig und die Patientenergebnisse dürfen nicht herausgegeben werden, wenn eine Kontrolle nicht den unten angegebenen Kontrollverhältnis-Spezifikationen entspricht. Der Test kann nach Überprüfung des Verfahrens oder Kontaktaufnahme mit dem Händler/Hersteller wiederholt werden. Bei Wiederholung des Tests eine frische Verdünnung von jeder Kontrolle und der Probe herstellen. Einige Laboratorien möchten bei jedem Testdurchlauf gegebenenfalls auch ihre laboreigenen Kontrollen mitlaufen lassen. Dieses Kontrollmaterial muss bei oder unter -20°C aufbewahrt werden, wobei wiederholte Einfrier-/Auftauzyklen zu vermeiden sind. Die Ergebnisse der Proben werden durch Konservierungsmittel, wie zum Beispiel Natriumazid (0,1% (w/v)) nicht beeinflusst.

Bei den Konzentrationen von Analyten, die bei bestimmten Erkrankungen nachgewiesen werden, handelt es sich um diejenigen, die von dem Hersteller für spezifische Populationen vorgegeben werden und stimmen nicht unbedingt mit den in der Literatur angegeben überein. Inzidenz-Grade, ihr Zusammenhang mit spezifischen Erkrankungen, Referenzbereiche und geeignete Cut-off-Punkte sind von dem jeweiligen Laboratorium für die von ihnen betreuten spezifischen Populationen zu berechnen.

Kontrollverhältnis-Spezifikationen

Protokoll	Spezifikationen
Qualitativ (Verhältnisse)	$\frac{\text{Extinktion für die Positive Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}}$ Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle
	$\frac{\text{Extinktion für die Negativ Kontrolle}}{\text{Extinktion der Referenzkontrolle}} < 0.95$
Quantitativ	Siehe Etikett für den zulässigen erwarteten Bereich (IU/mL) für die Positiv-Kontrolle.
	Konzentration der Negativ-Kontrolle <100 IU/mL

ERWARTETE WERTE

207 Serumproben von asymptomatischen und augenscheinlich gesunden Spendern bestehend aus einer ungefähr gleichen Zahl von Männern und Frauen im Alter zwischen 17 und 68 Jahren ohne Autoimmunerkrankungen in der Vorgeschichte wurden auf Anti-Tg-Antikörper der IgG-Klasse getestet. Drei Proben lieferten Resultate von 582, 997 bzw. 1396 IU/mL und diese wurden von den Cut-off-Berechnungen ausgeschlossen. Unter Verwendung des Mittelwertes von 204 Proben plus 2,5 Standardabweichungen wurde der Referenzbereich mit einem Cut-off von 100 IU/mL festgesetzt. 195/204 (95,6%) dieser Population hatten Werte unter 100 IU/mL. Die Distribution der 4,4%, die Werte über 100 IU/mL lieferten, ist unten aufgeführt.

<i>Referenzbereich</i>
≤100 IU/mL = Negativ
>100 IU/mL = Positiv

Nr.	Anti-Tg IU/mL	% Asymptomatische Population (n=204)
6	100-119.9	2.9
-	120-139.9	-
2	140-159.9	0.97
1	160-179.9	0.48

Unter Verwendung dieses Referenzbereichs wurde die Autoantikörperverteilung in 116 Proben von Schilddrüsenerkrankungen ermittelt. Die diagnostische Information stützt sich auf die mutmaßliche Diagnose der diese Proben bereitstellenden Labors. Patienten, die positiv auf Paul-Bunnell-Virämie testeten, sind ebenfalls einbezogen. Die Distribution der Ergebnisse ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Mutmaßliche Diagnose	n	Konzentration (IU/mL)			
		0 – 100	>100–1000	>1000–5000	>5000
Basedow/Thyreotoxikose	59	35	19	5	-
Hypothyreose	24	11	10	3	-
Hashimoto/Thyroiditis/Autoimmune Schilddrüsenerkrankung	33	25	8	-	-
Positiv für Paul-Bunnell-Virämie	31	30	1	-	-

LEISTUNGSMERKMALE

Übereinstimmung mit dem Agglutinations-Anti-Tg-Test

Eine Vergleichsstudie mit einem handelsüblichen Anti-Tg-Agglutinationstest wurde unter Verwendung von 299 Patientenproben durchgeführt. 28 Proben liefert ein Borderline-Resultat im Agglutinationstest; sie wurden nicht in die Gesamtübereinstimmung einbezogen. Die folgenden Ergebnisse wurden gewonnen:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
AGGLUTINATION ANTI-Tg	+ve	53	5*
	-ve	12†	201

Gesamtübereinstimmung = 93,7%. Die diskrepanten 5* und 12† Proben wurden in zwei handelsüblichen Anti-Tg-ELISAs getestet. Die 5* waren in beiden ELISAs negativ; von den 12† waren zehn in einem ELISA positiv und vier waren im zweiten ELISA positiv.

Übereinstimmung mit dem ELISA Anti-Tg-Test

Eine Vergleichsstudie wurde mit einem anderen Anti-Tg-ELISA unter Verwendung von 169 Patientenproben durchgeführt. Die folgenden Ergebnisse wurden gewonnen:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
ELISA ANTI-Tg	+ve	79	6
	-ve	1	83

Gesamtübereinstimmung = 95,9%. Die sieben diskrepanten Proben wurden in einem weiteren ELISA-Kit getestet. Das DIASTAT-Ergebnis wurde bei 6/7 (85,7%) bestätigt.

Verdünnungsmerkmale

Vier Verdünnungen von zwei Patientenproben wurden mit zwei Kitchargen getestet. Die folgende Tabelle zeigt die erhaltenen Mittelwerte und die um die Verdünnung korrigierte Wiederfindung.

Probe	Verdünnung	Mittelwert IU/mL	Für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung (%)
1	A	1564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Impräzision

1. **Die Intraassay-Impräzision** wurde durch Testen von vier Kontrollen in 12 Assays durch drei Laboranten und mit drei Testchargen, mit Replikation von vier, bestimmt.

Kontrolle	Mittelwert IU/mL	Quadratisches Mittel VK(%)
1	195	5.3
2	609	7.8
3	752	6.4
4	1755	10.5

2. **Die Interassay-Impräzision** wurde durch Testen von vier Kontrollen in 12 Tests durch drei Laboranten und mit drei Kitchargen, mit Replikation von vier, bestimmt.

Kontrolle	Mittelwert IU/mL	SD	VK (%)
1	195	20.7	10.6
2	609	54.2	8.9
3	752	59.4	7.9
4	1755	254.5	14.5

ANWENDUNGSGRENZEN

- Obgleich das Vorliegen hoher Antikörper-Titer gegen Thyroglobulin auf eine autoimmune Schilddrüsenerkrankung hindeutet, dürfen diese Parameter nur zusammen mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden in Betracht gezogen werden.
- Bei einigen Patienten können hohe Anti-Tg-Antikörper mit wenig oder keinen Hinweisen auf eine klinische Erkrankung vorliegen. Andererseits können bei einigen Patienten mit einer autoimmunen Schilddrüsenerkrankung nicht nachweisbare Spiegel dieser Antikörper vorhanden sein.
- Niedrige Anti-Tg-Titer können bei augenscheinlich gesunden Personen vorgefunden werden. Die klinische Bedeutung dieser Information ist gegenwärtig noch unklar.
- Für eine wiederholte Probengewinnung vom Patienten, wie zum Beispiel zur Überwachung, ist die gesamte Studienperiode über immer der gleiche Probentyp (Serum oder EDTA-, Li-Heparin- oder zitriertes Plasma) zu verwenden.

LITERATUR

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

1. Proben und Positiv- und Negativkontrollen müssen im Verhältnis 1:101 verdünnt werden. Standards oder Referenzkontrollen nicht verdünnen.
2. 100µL Referenzkontrolle/Standards (in Doppelbestimmung), vorverdünnte Positiv- und Negativkontrollen und Proben in die entsprechenden gekennzeichneten Vertiefungen des Mikrotiterstreifens geben.
3. 60 ± 10 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
4. Streifen 5-mal waschen.
5. In jede Vertiefung 100 µL IgG-Konjugat 1 geben.
6. Incubate 30±5 minutes at 18-25° C.
7. Streifen 5-mal waschen.
8. In jede Vertiefung 100 µL Substrat geben.
9. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
10. In jede Vertiefung 100 µL Stopplösung geben.
11. Extinktion bei 550 nm ablesen.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Etalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoins de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

ITALIANO: INDICAZIONI PER L'USO

Il test antitireoglobulina (anti-Tg) DIASTAT[®] è un dosaggio immunoenzimatico, quantitativo/qualitativo ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) per la rivelazione degli autoanticorpi specifici verso la tireoglobulina nel siero umano o EDTA, nel plasma litio-eparinato o citrato. È indicato quale mezzo adiuvante nella diagnosi delle affezioni autoimmuni della tiroide e, da solo, non va considerato come definitivo. I livelli autoanticorpali rappresentano uno dei parametri del processo diagnostico a più criteri.

INTRODUZIONE

Si ritiene che la tireoglobulina (Tg), la perossidasi tiroidea (TPO) e il recettore TSH sono gli autoantigeni principali associati alla tiroidite autoimmune cronica. La diagnosi clinica è, di norma, basata sulla presenza di autoanticorpi per la Tg e la TPO nel siero o nel plasma¹. Nel morbo di Graves (ipertiroidismo primario cronico), il recettore TSH è l'antigene che interessa più direttamente il quadro clinico della malattia².





La tireoglobulina, una glicoproteina solubile in acqua di 660kD³, è il precursore della triiodotironina e della tiroxina, gli ormoni secreti dalla tiroide. Nel 1956, Roitt *et al*⁴ hanno dimostrato per primi la presenza di autoanticorpi anti-Tg nei pazienti affetti da tiroidite di Hashimoto, impiegando una precipitazione diffusa mediante gel.

Gli autoanticorpi anti-Tg appartengono predominantemente alla classe delle IgG⁵. Vengono osservati, spesso con gli autoanticorpi TPO, nella maggioranza dei casi di morbo di Graves e tiroidite di Hashimoto, comprese le altre varianti dell'ipertiroidismo primario cronico, come mixedema o tiroidite asintomatica. Sono pure stati osservati nella tiroidite spontanea o postpartum senza dolore⁶, nell'autoimmunità tiroidea con artrite reumatoide^{7,8} e nelle affezioni autoimmuni non tiroidee, quali il morbo di Addison e il diabete mellito di tipo 1⁸. A seconda della metodica e del punto di cut-off del dosaggio, sono stati pure rivelati in individui asintomatici, apparentemente sani (dall'1,3% al 14,6%^{8,9}). Il ruolo degli autoanticorpi Tg circolanti non è stato chiarito; è possibile che siano indice della malattia poiché, a differenza degli autoanticorpi TPO, non sembrano essere patogeni.

PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

I pozzetti delle strip di microtitolazione sono rivestiti con l'antigene Tg umano purificato. Durante la prima incubazione, gli autoanticorpi specifici nel siero o plasma diluito si legano con la superficie rivestita con antigene; i pozzetti sono quindi lavati per rimuovere i componenti non legati. Nella seconda incubazione, il coniugato - anticorpi, marcati con un enzima, verso l'IgG umana - si lega a qualsiasi autoanticorpo adeso alla superficie. Dopo un ulteriore lavaggio, gli autoanticorpi specifici vengono tracciati per incubazione con il substrato. L'aggiunta della soluzione bloccante pone fine alla reazione, generando un prodotto finale colorato. La quantità di coniugato legato viene misurata in unità di assorbanza. Nel protocollo qualitativo, la quantità di coniugato legato dal campione viene rapportata contro quella legata dal controllo di riferimento, mentre in quello quantitativo, la concentrazione degli autoanticorpi anti-Tg può essere valutata per interpolazione dalla curva dose-risposta basata sugli standard. Gli standard sono rapportati contro il preparato di riferimento internazionale di antitireoglobulina 65/93.

COMPONENTI DEL KIT

A	Coniugato IgG 1	1 x 15 mL	Anticorpi, marcati con fosfatasi alcalina per l'IgG umana, tampone Tris, stabilizzante delle proteine, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
B	Substrato	1 x 15 mL	Mg ²⁺ , fenoltaleina monofosfato (PMP), soluzione tampone. Pronto per l'uso. Conservare evitando l'esposizione alla luce.	
C	Soluzione bloccante	1 x 15 mL	Idrossido di sodio, EDTA, tampone carbonato (pH >10). Pronta all'uso.	
D	Tampone di lavaggio concentrato (16X)	3 x 25 mL	Tampone borato, azide di sodio 0,4% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
E	Pozzetti rivestiti con Tg e supporto per strip	8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip	Rivestiti con antigene Tg, in confezione di alluminio risigillabile con essiccante. Codice a colori: BLU REALE . I singoli pozzetti possono essere staccati da ciascuna strip di microtitolazione.	
F	Diluente per campioni concentrato (5X)	1 x 25 mL	Tampone fosfato, stabilizzante delle proteine, azide di sodio 0,5% (p/v). Diluire prima dell'uso.	
1-5	Standard anti-Tg	5 x 1,0 mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). 0, 100, 400, 1500, 5000 IU/mL. Pronto per l'uso.	
6	Controlli di riferimento anti-Tg	1 x 1,5 mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). Pronto per l'uso.	
+/-	Controllo positivo Controllo negativo	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Plasma umano, azide di sodio <0,1% (p/v). Diluire 1:101 con il diluente per campioni diluito prima dell'uso, come per i campioni.	
	Foglio illustrativo			

CONSERVAZIONE DEI REAGENTI

Stabilità del kit aperto

Un kit è stato aperto e utilizzato in tre occasioni, in un periodo di tre mesi, con nessun effetto prestazionale avverso.

Note sulla manipolazione e sulla procedura

1. Conservare i componenti del kit a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino alla data di scadenza riportata sulle etichette. Non utilizzare i reagenti scaduti.
2. Non miscelare componenti appartenenti a lotti di numero diverso.
3. Non congelare i kit.
4. Prima dell'uso, diluire il tampone di lavaggio concentrato, il diluente per campioni concentrato e i controlli positivi e negativi. Tutti gli altri reagenti sono pronti per l'uso.
5. Una volta diluiti, il tampone di lavaggio e il diluente per campioni sono stabili a temperature comprese tra 2° C e 8° C per un periodo massimo di 6 mesi, in assenza di contaminazione microbica.
6. Riporre le strip di microtitolazione inutilizzate nella confezione di alluminio, contenente essiccante, e conservare a temperature comprese tra 2° C e 8° C fino al momento dell'uso.
7. Il supporto della piastra è stato adattato per essere usato solo con i pozzetti staccabili.
8. Conservare il substrato senza esporlo alla luce.
9. Evitare di contaminare i reagenti. Per ciascun reagente o a ogni manipolazione dei campioni, utilizzare un nuovo puntale per le pipette.

Indicazioni di deterioramento

Il substrato deve essere di colore giallo pallido. Una colorazione rosa è indice di contaminazione e il reagente va smaltito. La torbidità o la precipitazione di un componente qualsiasi è indice di deterioramento e il componente va smaltito.

Raccolta e conservazione dei campioni

Il dosaggio è indicato per i campioni di siero o EDTA, plasma litio-eparinato o citrato; non utilizzare campioni lipemici, emolizzati o torbidi. Miscelare accuratamente i campioni scongelati prima del test; evitare il congelamento e lo scongelamento ripetuti. Non inattivare mediante calore i campioni, per evitare di ottenere falsi positivi.

I campioni possono essere conservati non diluiti o diluiti 1:101 nel diluente per campioni diluito a temperature di -20°C o $2-8^{\circ}\text{C}$ per due settimane.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI**Per solo uso diagnostico *in vitro*.****Precauzioni di sicurezza**

1. Attenersi strettamente alle istruzioni contenute in questo opuscolo, in particolare per quanto concerne le condizioni di manipolazione e di conservazione.
2. Gli standard e i controlli contengono plasma umano, analizzato mediante metodologie approvate dall'FDA per l'antigene di superficie per il virus dell'epatite B, l'antigene del virus dell'epatite C, l'antigene e gli anticorpi dell'HIV e dimostrato non reattivo/negativo. Considerato che nessun test offre la certezza assoluta dell'assenza di agenti infettivi, gli standard e i controlli vanno considerati potenzialmente infetti e manipolati con le stesse precauzioni adottate per altri materiali potenzialmente biopericolosi. Nel manuale CDC/NIH Health Manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3^a edizione, 1993, viene descritto come manipolare questi materiali, conformemente alla buona pratica di laboratorio. Questo non è applicabile negli Stati Uniti d'America.
3. Non pipettare con la bocca.
4. Non fumare, non mangiare, non bere né usare cosmetici in aree dove vengono manipolati i kit e campioni.
5. Proteggere adeguatamente qualsiasi eruzione cutanea, taglio, abrasione o altre lesioni cutanee.
6. Gli standard, i controlli, il coniugato, il concentrato diluente per campioni e il concentrato tampone di lavaggio contengono azide di sodio, che reagisce con tubature in piombo e rame, formando azidi metalliche altamente esplosive. Smaltire negli scarichi unitamente ad abbondanti quantità d'acqua per evitare l'accumulo di azide.
7. La soluzione bloccante contiene idrossido di sodio. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e le mucose. Eventuali spandimenti vanno mescolati con acqua abbondante e raccolti con materiale assorbente. Se viene a contatto con la pelle o gli occhi, irrigare con acqua e rivolgersi immediatamente al medico.
8. Il substrato contiene PMP, Bronidox L e dietanolamina. Evitare il contatto con la pelle, gli occhi e il sistema respiratorio. In caso di contatto con queste parti risciacquare con acqua e consultare un medico.
9. Le schede dei dati di sicurezza per tutti i componenti pericolosi contenuti in questo kit sono disponibili a richiesta presso Euro Diagnostica.

B.

SUBS

Attenzione

Contiene: Dietanolamine

H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



C.

SOLN	STOP
------	------

Attenzione

Contiene: Idrossido di sodio

H315:	Provoca irritazione cutanea.
H319:	Provoca grave irritazione oculare.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso.
P302+P352:	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone.
P305+P351+P338:	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti.
P332+P313:	In caso di irritazione della pelle: consultare un medico.
P337+P313:	Se l'irritazione degli occhi persiste, consultare un medico.



D. and F.

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Attenzione

Contiene: Azide di sodio

H302:	Nocivo se ingerito.
EUH032:	A contatto con acidi libera gas molto tossici.
H412:	Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.
P264:	Lavare accuratamente le mani dopo l'uso.
P280:	Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso..
P301+P312:	IN CASO DI INGESTIONE accompagnata da malessere: contattare un CENTRO ANTIVELENI o un medico.
P273:	Non disperdere nell'ambiente.

PREPARAZIONE

Materiali e attrezzature richiesti ma non forniti

1. Lettore per piastra da 96 pozzetti/strip con filtro da 550nm (540-565nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10 μ L, 100 μ L, 1mL. Pipetta automatica per dispensare 100 μ L. Pipetta automatica per dispensare 200 μ L per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.
3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1 \times 100mL, 1 \times 400mL.
4. Contenitore di 1mL di volume.
5. Acqua distillata/deionizzata.
6. Salviette assorbenti di carta.
7. Timer per intervalli di 30 e 60 minuti.

Preparazione del dosaggio

Prima dell'uso, lasciar riscaldare i componenti del kit, comprese le strip di microtitolazione, fino a temperature comprese tra 18° C e 25° C per 30-60 minuti. Miscelare delicatamente i reagenti per inversione.

Non diluire il controllo di riferimento.

Diluire i seguenti reagenti e miscelare accuratamente.

Reagente	Volume	Aggiungere
Tampone di lavaggio concentrato	1 flaconcino	375 mL di acqua distillata/deionizzata.
Diluyente per campioni concentrato	1 flaconcino	100 mL di acqua distillata/deionizzata.
Controlli positivi e negativi/campioni	10µL	1 mL di diluyente per campioni diluito

I pozzetti di microtitolazione sono forniti in strip di otto. Nel caso in cui fossero necessari pozzetti in numero superiore a multipli di otto, eseguire quanto segue:

1. Rimuovere la strip dal supporto spingendo sulla parte inferiore dei pozzetti.
2. Staccare il numero di pozzetti voluto.
3. Inserire il foro rettangolare nel bordo inferiore (H) della scanalatura del supporto.
4. Verificare che il foro quadrato, con la tacca alla sinistra, sia posizionato saldamente lungo il bordo superiore (riga A).

PROTOCOLLO PER IL DOSAGGIO

Protocollo qualitativo: analizzare il controllo di riferimento, i controlli positivo e negativo e i campioni.

Protocollo quantitativo: analizzare gli standard (1-5), i controlli positivo e negativo e i campioni.

1. Marcare i pozzetti per l'identificazione.
2. Dispensare con la pipetta 100µL di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo prediluiti e i campioni prediluiti dei pazienti negli appositi pozzetti. Ricordarsi di cambiare il puntale della pipetta ad ogni aggiunta di volumi. Questa operazione non deve richiedere più di 15 minuti per un ogni serie di standard/controlli/campioni.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Decantare il contenuto delle strip per inversione rapida in un lavello idoneo allo smaltimento di materiali biologici, tenendo presente il potenziale infettivo dei campioni. Asciugare le strip capovolte con salviette di carta assorbente.
5. Lavare i pozzetti **cinque volte** con 200µL di tampone di lavaggio diluito. **Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.**
6. Aggiungere 100µL di coniugato IgG 1 in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C. **Non decantare.**
11. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto, nello stesso ordine e alla stessa velocità del substrato. Picchiettare delicatamente i pozzetti per miscelare.
12. Leggere le strip entro 24 ore a 550nm (540-565nm).

CALCOLO E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Valutare ciascun saggio separatamente per calcolare e interpretare i risultati.

Protocollo qualitativo

Calcolare il rapporto del valore di assorbanza (densità ottica) per i controlli positivi e negativi e per ciascun campione.

$$\text{Rapporto di assorbanza} = \frac{\text{valore d'assorbanza del campione} \ominus \text{controllo}}{\text{valore medio d'assorbanza del controllo di riferimento}}$$

Gli operatori devono calcolare il valore di normalità (punto di cut-off) tra campioni positivi e negativi, che sia specifico alla loro popolazione di pazienti. I risultati ottenuti dalle popolazioni di pazienti, adottate negli studi clinici condotti da Euro Diagnostica, suggeriscono i seguenti valori di normalità:

<u>Rapporto di assorbanza</u>	<u>Interpretazione dei risultati</u>
<0,95	Negativo
≥da 0,95 ≤1,0	Valore borderline: si consiglia di ripetere il test
>1,0	Positivo

Protocollo quantitativo

Mettere in grafico il valore medio d'assorbanza per ciascuno standard contro la concentrazione standard \log_{10} (vedere la tabella che segue) su carta grafica appropriata. Leggere la concentrazione dei controlli e dei campioni sulla curva standard; un grafico tipico è riportato di seguito a scopo di riferimento e non va pertanto utilizzato per l'interpretazione dei risultati. È pure accettabile la curva logistica a 4 parametri (4PL), logit-log o flessibile.

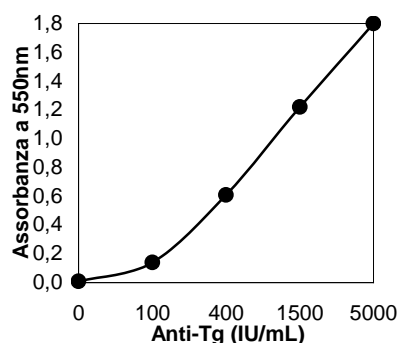
I campioni con assorbanza superiore allo standard 5 (5000 IU/mL) sono fuori intervallo di dosaggio e vanno riportati come >5000 IU/mL, diluiti e rianalizzati, correggendo il fattore di diluizione.

NOTA: analogamente a qualsiasi metodo di misura degli anticorpi, questo dosaggio determina l'attività degli anticorpi presenti nel campione, non la loro concentrazione. L'attività può essere influenzata da diversi parametri, come l'avidità degli anticorpi.

Concentrazioni standard

Numero standard	Concentrazione IU/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Curva standard tipica



CONTROLLO DELLA QUALITÀ

Verificare che la manutenzione e calibrazione del lettore di piastre vengano eseguite in modo adeguato e in conformità alle istruzioni del costruttore, e che venga impiegata la lunghezza d'onda corretta. Gli operatori devono accertarsi di aver compreso appieno le istruzioni per il dosaggio, in particolare per quanto concerne le avvertenze, le precauzioni e le annotazioni sulla manipolazione e la procedura. Inoltre, prima di riferire i risultati dei test al paziente, gli operatori devono aver dimostrato di essere in grado di ottenere specifiche prestazionali, in termini di precisione e di intervallo riportabile dei risultati, equiparabili a quelle stabilite dal costruttore. Si consiglia di eseguire i controlli positivo e negativo prediluiti in duplicato per tutti i dosaggi, al fine di monitorare la qualità della procedura. Eseguire il controllo di riferimento, pronto per l'uso, in duplicato per tutti i dosaggi qualitativi.

Presupponendo che le specifiche di precisione descritte dal costruttore siano soddisfatte, qualora un controllo qualsiasi non soddisfi le specifiche del rapporto di controllo riportate di seguito, il dosaggio va considerato non valido e non va riportato. L'operatore può ripetere il dosaggio, dopo aver riesaminato la procedura seguita, oppure rivolgersi al distributore o costruttore. Se il dosaggio viene ripetuto, preparare una nuova diluizione di ciascun controllo e campione. Per ciascuna serie analitica, i laboratori possono scegliere di includere i propri controlli interni. Conservare i materiali di controllo a temperature pari o inferiori a -20°C; evitare cicli di congelamento e scongelamento ripetuti. I preservanti, come l'azide di sodio a 0,1% (p/v), non incidono in alcuna misura sui risultati dei campioni. I livelli degli analiti identificati in patologie specifiche sono quelli stabiliti dal costruttore per popolazioni specifiche, per il qual motivo è possibile che non riflettano quanto riportato nella letteratura. I livelli di incidenza, il loro rapporto con patologie specifiche, gli intervalli di riferimento e i valori di normalità appropriati devono essere calcolati per le popolazioni specifiche servite dagli operatori.

Specifiche del rapporto di controllo

Protocollo	Specifiche
Qualitativo (rapporti)	$\frac{\text{Assorbanza controllo positivo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$ vedere l'etichetta del controllo positivo
	$\frac{\text{Assorbanza controllo negativo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}} < 0,95$
Quantitativo	Vedere l'etichetta del controllo positivo per l'intervallo accettabile previsto (IU/mL).
	Concentrazione controllo negativo < 100 U/mL

VALORI ATTESI

207 campioni sierici, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, comprendenti un rapporto pressoché eguale di soggetti maschili e femminili, di età compresa tra 17 e 68 anni, con anamnesi negativa di affezioni autoimmuni, sono stati analizzati per gli anticorpi anti-Tg della classe IgG. I risultati di tre campioni erano 582, 997 e 1396 IU/mL, per il qual motivo questi sono stati esclusi dal calcolo dei valori di soglia (cut-off). Utilizzando il valore medio di 204 campioni più 2,5 deviazioni standard, si è stabilito l'intervallo di riferimento con un punto di cut-off di 100 IU/mL. I valori di 195 dei 204 campioni (95,6%) di questa popolazione erano inferiori a 100 IU/mL. La distribuzione del 4,4% con valori superiori a 100 IU/mL è riportata di seguito.

Intervallo di riferimento
 ≤ 100 IU/mL = Negativo
 > 100 IU/mL = Positivo

N.	Anti-Tg IU/mL	% popolazione asintomatica (n=204)
6	100-119,9	2,9
-	120-139,9	-
2	140-159,9	0,97
1	160-179,9	0,48

Adottando questo intervallo di riferimento, si è ottenuta la distribuzione degli autoanticorpi nei 116 campioni, provenienti da gruppi di malattia tiroidea. I dati diagnostici sono basati sulla diagnosi presunta data dai laboratori che hanno fornito i campioni. Sono stati inclusi anche i pazienti che presentavano positività per la viremia di Paul-Bunnel. La distribuzione dei risultati è riportata nella tabella che segue.

Diagnosi presunta	n	Intervallo (IU/mL)			
		0 – 100	>100–1000	>1000–5000	>5000
Graves/tireotossicosi	59	35	19	5	-
Ipotiroidismo	24	11	10	3	-
Morbo di Hashimoto/tiroidite/Malattia autoimmune della tiroide	33	25	8	-	-
Positivi per viremia Paul-Bunnel	31	30	1	-	-

DATI SULLE PRESTAZIONI

Concordanza con il test di agglutinazione anti-Tg

È stato condotto uno studio comparativo con un test di agglutinazione anti-Tg, disponibile nel mercato, utilizzando i campioni di 299 pazienti. Il test di agglutinazione ha dato risultati borderline in 28 campioni, i quali sono stati esclusi dalla concordanza totale. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
AGGLUTINAZIONE ANTI-Tg	+ve	53	5*
	-ve	12†	201

Concordanza totale = 93,7%. I campioni discrepanti 5* e 12† sono stati analizzati con due ELISA anti-Tg, disponibili nel mercato. I 5* sono risultati negativi in ambedue questi ELISA; dei 12†, dieci erano positivi in un ELISA e quattro positivi nel secondo ELISA.

Concordanza con il dosaggio anti-Tg

È stato condotto uno studio comparativo con un altro ELISA anti-Tg, utilizzando i campioni di 169 pazienti. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

		DIASTAT	
		+ve	-ve
ELISA ANTI-Tg	+ve	79	6
	-ve	1	83

Concordanza totale = 95,9%. I sette campioni discrepanti sono stati analizzati con un altro kit ELISA. Il risultato ottenuto con DIASTAT è stato confermato in 6 dei 7 campioni (85,7%).

Caratteristiche di diluizione

Sono state analizzate quattro diluizioni dei campioni di due pazienti, utilizzando due lotti di kit. Nella tabella che segue sono riportati i valori medi ottenuti e la percentuale di recupero.

Campione	Diluizione	Valore medio IU/mL	% di recupero
1	A	1564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Imprecisione

- Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando quattro controlli in 12 dosaggi, utilizzando tre operatori e tre lotti di kit, con quattro repliche.

Controllo	Valore medio IU/mL	Radice quadrata media %CV
1	195	5,3
2	609	7,8
3	752	6,4
4	1755	10,5

- Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando quattro controlli in 12 dosaggi, utilizzando tre operatori e tre lotti di kit, con quattro repliche.

Controllo	Valore medio IU/mL	DS	%CV
1	195	20,7	10,6
2	609	54,2	8,9
3	752	59,4	7,9
4	1755	254,5	14,5

LIMITI D'IMPIEGO

1. Sebbene la presenza di titoli elevati di anticorpi verso la tireoglobulina sia indice di malattia autoimmune della tiroide, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
2. In alcuni soggetti possono essere presenti elevati livelli di anticorpi anti-Tg con scarsa o nessuna evidenza della patologia clinica. Per contro, in alcuni pazienti con malattia autoimmune della tiroide, i livelli di questi anticorpi possono essere non rivelabili.
3. Bassi titoli di anti-Tg possono essere rivelati in soggetti apparentemente sani; il significato clinico di questi dati non è stato tuttora chiarito.
4. Nel caso di analisi ripetute sui campioni dei pazienti, ad es. per monitoraggio, utilizzare lo stesso tipo di campione (siero o EDTA, plasma litio-eparinato o citrato) per l'intera durata del periodo di studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

1. Diluire i campioni e i controlli positivo e negativo 1:101. Non diluire gli standard o il controllo di riferimento.
2. Aggiungere 100µL di controllo di riferimento/standard in duplicato, i controlli positivo e negativo e i campioni prediluiti nei pozzetti marcati della strip di microtitolazione.
3. Incubare 60±10 minuti a 18-25° C.
4. Lavare le strip 5 volte.
5. Aggiungere 100µL di coniugato IgG 1 in ciascun pozzetto.
6. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
7. Lavare le strip 5 volte.
8. Aggiungere 100µL di substrato in ciascun pozzetto.
9. Incubare 30±5 minuti a 18-25° C.
10. Aggiungere 100µL di soluzione bloccante in ciascun pozzetto.
11. Leggere l'assorbanza a 550nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Etalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoins de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

SVENSKA : AVSEDD ANVÄNDNING

DIASSTAT[®] anti-thyroglobulin (anti-Tg) är ett kit för kvantitativ/kvalitativ enzymkopplad immunosorbenanalys (ELISA) för detektion av autoantikroppar specifika för thyroglobulin i humant serum, EDTA-, litiumheparin eller citratplasma. Det är avsett som en hjälp vid diagnos av autoimmuna tyroideasjukdomar. Analysresultatet ska inte användas ensamt för diagnos. Mängden av autoantikroppar är bara en parameter i en diagnostisk process baserad på ett antal kriterier.

INLEDNING

Tyreoglobulin (Tg), tyreperoxidas (TPO) och TSH-receptor är betydande autoantigener med relation till kronisk autoimmun tyreoidit. Klinisk diagnos är vanligen baserad på närvaron av serum-/plasma-antikroppar mot Tg och TPO¹. I Graves sjukdom (kronisk primär hypertyroidism) är TSH-receptorn det antigen som är mest direkt involverat i sjukdomens kliniska manifestation.

Tyreoglobulin är en föregångare till tyreoideahormonerna trijodtyronin (T3) och tyroxin (T4). Förekomst av anti-Tg-antikroppar hos patienter med Hashimotos struma demonstrerades först 1956 av Roitt, et al². Anti-Tg-antikroppar detekteras ofta tillsammans med anti-TPOantikroppar vid Graves sjukdom (kronisk primär hypertyreos) och Hashimotos struma, såväl som andra varianter av kronisk primär hypotyreos som myxödem och asymtomatisk tyreoidit. De har även detekterats i spontan eller postpartum smärtfri tyreoidit (3), i förbindelser mellan tyreoid autoimmunitet och reumatoid artrit^{4,5} och i icke-tyreoida autoimmuna sjukdomar såsom Addisons sjukdom och diabetes mellitus av typ I⁵. De detekteras även hos en procentandel uppenbart friska, asymptomatiske individer som varierar beroende på analysens metod och vilket gränsvärde som används. Anti-Tg-antikropparnas roll har inte fastställts. De verkar inte vara patogena, utan kan helt enkelt vara indikatorer för sjukdom.

Aktuella metoder för detektering av anti-Tg-antikroppar omfattar passiv hemagglutination, immunofluorescensmetod, radioimmunoanalys och enzymlänkad immunosorbent analys (ELISA). ELISA-test erbjuder ökad sensitivitet, enkelhet och kvantifiering.





PROCEDURENS PRINCIPER

Brunnarna på mikrotiterstrifen är belagda med renat tyreoglobulinantigen. Vid den första inkubationen binder sig specifika autoantikroppar i utspätt serum till antigenbeläggningen. Mikrobrunnarna tvättas sedan för att avlägsna obundna serumkomponenter. Ett konjugat av enzymmärkta antikroppar mot human-IgG binder sig till ytbundna antikroppar i den andra inkubationen. Efter ytterligare ett tvättsteg spåras specifika antikroppar genom inkubation med substratlösning. Tillsats av stopplösningen avslutar reaktionen som resulterar i en färgad slutprodukt. Intensiteten hos den resulterande magentafärgen avläses spektrofotometriskt.

I den kvantitativa proceduren kan mängden bundet konjugat i närvaro av okänt serum- eller plasmaproov interpoleras från en dosresponskurva. Denna kurva baseras på standarder som kalibreras mot internationella referenspreparat innehållande anti-tyreoglobulin 65/93.

I den kvalitativa proceduren jämförs mängden bundet konjugat i närvaro av okänt serum- eller plasmaproov med mängden som bundits i närvaro av en känd koncentration anti-Tg-antikroppar i anti-Tg-referenskontrollen.

KOMPONENTER I TESTKITET

A	IgG-konjugat 1	1 x 15mL	Antikroppar mot humant IgG, som är märkta med alkaliskt fosfat, tris-buffert, proteinstabilisator, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
B	Substrat	1 x 15mL	Mg ²⁺ , fenolftaleinmonofosfat (PMP), buffert. Klar att använda. Förvaras mörkt.	
C	Stopplösning	1 x 15mL	Natriumhydroxid, EDTA, karbonatbuffert (pH >10). Klar att använda.	
D	Koncentrerad (16x) tvättbuffert	3 x 25mL	Boratbuffert, 0,4% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
E	Tg-belagda brunnar samt striphållare	Plattor med 12x8 mikrotiter-brunnar	Belagda med Tg-antigen, förpackade i återförslutbar folieförpackning tillsammans med torkmedel. Färgkodade BLÅ. Enskilda brunnar kan brytas loss från plattan.	
F	Koncentrerad spädvätska (5x)	1 x 25mL	Fosfatbuffert, proteinstabilisator, 5% (v/v) Triton X-100, 0,5% (m/v) natriumazid. Spädes före användning.	
1-5	Standarder med anti-Tg	5 x 1,0mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. 0, 100, 400, 1500, 5000 IE/mL. Klar att använda.	
6	Anti-Tg referenskontroll	1 x 1,5mL	Human plasma, buffert, <0,1% (m/v) natriumazid. Klar att använda.	
+/-	Positiv kontroll Negativ kontroll	1 x 0,2mL 1 x 0,1mL	Human plasma, <0,1% (m/v) natriumazid. Spädes 1:101 med utspädd spädvätska före användning, på samma sätt som proven.	
	Bruksanvisning			

FÖRVARING

Hållbarhet efter öppnandet

Ett kit öppnades och återvändes vid tre tillfällen under en tremånadersperiod utan försämring av egenskaperna.

Hantering och förfarande

- Lagra komponenterna vid 2-8° C. Använd inte någon komponent efter det utgångsdatum som anges på etiketten.
- Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
- Frys inte komponenterna.
- Glöm inte att späda koncentrerad tvättbuffert, spädvätska och positiva och negativa kontroller före användning. De övriga komponenterna är klara att använda.
- Tvättbuffert och spädvätska för prov är stabila efter utspädning under upp till 6 månader, om de förvaras vid 2-8° C och inte kontamineras med mikroorganismer.
- Lägg tillbaka oanvända mikrotiterstrips i folieförpackningen och förvara vid 2-8° tillsammans med torkmedlet, tills produkten skall användas på nytt.
- Striphållaren är utformad för strips med lossbrytbara brunnar.
- Substratet skall förvaras mörkt.
- Undvik att kontaminera reagensen. Använd en ny engångspipett för varje pipettering av reagens respektive prov.

Tecken på försämrade egenskaper

Substratet skall ha blekgul färg. Om färgen är skär har substratet kontaminerats och måste kasseras. Grumlighet eller fällning i någon komponent innebär att komponenten inte längre är i fullgott skick och måste kasseras.

Provtagning och provförvaring

Analysen är avsedd för serum/plasmaprov (EDTA-, Li-Heparin eller citratplasma); använd inte prov som är lipemiska, hemolyserade, ikteriska eller grumliga. Blanda upptinade prov omsorgsfullt före analysen, och undvik att återfrysa upptinade prov. Värmeinaktivera inte proven, eftersom detta kan orsaka falskt positiva svar.

Prov kan sparas utspädda eller spädda 1:101 med utspädd spädvätska vid -20° C eller vid 2-8° C i två veckor.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSMÅTT**Avsett endast för in vitrodiagnostik.****Försiktighetsmått**

1. Följ anvisningarna i den här texten noggrant, särskilt i fråga om hantering och lagring.
2. Standarder och kontroller innehåller humant plasma som testats med FDA-godkända metoder för analys av antigen mot hepatit B, HCV-, HIV-1- och HIV-2-antikroppar, och som därvid befunnits negativa. Eftersom det inte finns någon känd testmetod som garanterar att inga infektiösa agens förekommer bör standard- och kontrollproven behandlas som potentiellt infektiösa, och hanteras med samma försiktighet som annat potentiellt farligt material. I manualen från CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 3e upplagan 1993, beskrivs hur sådana material bör hanteras enligt god laboratoriesed. Denna gäller i USA.
3. Pipettera inte med munnen.
4. I områden där kitet eller proven hanteras får ingen rökning, förtäring eller sminkning förekomma.
5. Alla hudskador som skärsår, skrubbsår osv skall skyddas på lämpligt sätt.
6. I standarderna, kontrollerna, konjugatvätskan, spädvätskan och tvättbufferten ingår natriumazid, som kan reagera med bly och koppar och därvid ge upphov till explosiva metallazider. När vätskorna spolats ut i vask skall de spädas med stora mängder vatten för att förhindra att azider ansamlas.
7. Stopplösningen innehåller natriumhydroxid. Undvik kontakt med hud, ögon och slemhinnor. Spill bör samlas upp med stora mängder vatten. Om vätskan kommer i kontakt med huden eller ögonen sköljs den exponerade ytan med vatten och kontakt tas med läkare omedelbart.
8. Substratet innehåller PMP, Bronidox L och dietanolamin. Undvik kontakt med hud, ögon och andningssystem. Om kontakt med hud, ögon eller andningssystemet sker skölj med vatten och sök medicinsk hjälp.
9. På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.

B.**Varning**

SUBS

Innehåller: Dietanolamin

H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****C.**

SOLN	STOP
------	------

Innehåller: Natriumhydroxid

H315:	Irriterar huden.
H319:	Orsakar allvarlig ögonirritation.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P302+P352:	VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten.
P305+P351+P338:	VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja.
P332+P313:	Vid hudirritation: Sök läkarhjälp.
P337+P313:	Vid bestående ögonirritation: Sök läkarhjälp.

**Varning****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

Innehåller: Natriumazid

H302:	Skadligt vid förtäring.
EUH032:	Utvecklar mycket giftig gas vid kontakt med syra.
H412:	Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.
P264:	Tvätta händerna grundligt efter användning.
P280:	Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd.
P301+P312:	VID FÖRTÄRING: Kontakta GIFTINFORMATIONSCENTRAL eller läkare om du mår dåligt.
P273:	Undvik utsläpp till miljön.

F Ö R B E R E D E L S E R

Material/utrustning som behövs men som inte medföljer

1. Avläsare med filter för 550 nm, för avläsning av plattor med 96 provbrunnar (avläsning vid 540-565 nm kan accepteras).
2. Precisionspipetter, engångs, 10 µL, 100 µL, 1 mL. Automatisk pipett för dosering av 100 µL. Automatisk pipett för dosering av 200 µL vid manuell tvättning; automatisk platttvättare kan användas.
3. Mätcylinder av glas/plast: 1×100 mL, 1×400 mL.
4. Behållare med volymen 1 mL.
5. Destillerat/avjoniserat vatten.
6. Pappershanddukar.
7. Timer för intervall om 30 och 60 minuter.

Förberedelser för analysen

Låt alla komponenter i kitet, inklusive mikrotiterstripsen, anta en temperatur på 18-25° C, under 30-60 minuter före användning. Blanda reagensen genom försiktig vändning upp och ned.

Späd inte referenskontrollen.

Späd följande reagens och blanda omsorgsfullt.

Reagens	Volym	Tillsätt
Koncentrerad tvättbuffert	1 flaska	375 mL destillerat/avjoniserat vatten
Koncentrerad spädvätska	1 flaska	100 mL destillerat/avjoniserat vatten
Positiva och negativa kontroller/analysprov	10 µL	1 mL utspädd spädvätska

Brunnarna för mikrotitrering sitter ihop i grupper om åtta brunnar. Om något antal som inte är delbart med åtta skall användas gör man så här:

1. Lossa stripet från hållaren genom att trycka underifrån.
2. Bryt loss det antal brunnar som behövs.
3. Haka fast det rektangulära hålet vid nederkanten (rad H) på hållarens spår.
4. Se till att det kvadratiska hålet, med hacket till vänster, sitter ordentligt fast vid överkanten (rad A).

ANALYSFÖRFARANDE

Kvalitativ analys: använd referenskontroll, positiva och negativa kontroller samt patientprov.

Kvantitativ analys: använd standarder (1-5), positiva och negativa kontroller samt patientprov.

1. Gör ett schema över brunnarna för identifiering.
2. Pipettera 100 µL referenskontroll/standard i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller samt patientprov i respektive brunnar. Kom ihåg att byta pipettspets mellan pipetteringarna. Detta steg bör inte få ta mer än 15 minuter för varje uppsättning av standarder, kontroller och patientprov.
3. Inkubera under 60±10 minuter vid 18-25° C.
4. Dekantera innehållet i brunnarna genom att snabbt vända plattan upp och ned över en vask som är godkänd för biologiska vätskor. Tänk på att proven kan vara infektiösa. Sug upp restfukt från de tömda plattorna med pappershandukar.
5. Tvätta brunnarna fem gånger med minst 200 µL utspädd tvättbuffert. Häll av och sug upp restfukt efter varje tvättning.
6. Tillsätt 100 µL konjugat till varje brunn.
7. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C.
8. Upprepa stegen 4 och 5.
9. Tillsätt 100 µL substrat till varje brunn.
10. Inkubera under 30±5 minuter vid 18-25° C. Häll inte av vätskan.
11. Tillsätt 100 µL stopplösning till varje brunn, i samma ordning och med samma takt som tillsatsen av substrat. Knacka försiktigt på brunnarna för att blanda.
12. Avläs plattorna vid 550 nm (540-565 nm) inom 24 timmar.

BERÄKNINGAR OCH BEDÖMNING AV RESULTATET

Vid beräkning och bedömning av resultatet skall varje analys behandlas separat.

Kvalitativ analys

Beräkna absorbanskvoten (optisk täthet) för de positiva och negativa kontrollerna och för patientproven.

$$\text{Absorbanskvoten} = \frac{\text{Absorbansvärdet för patientprov eller kontroll}}{\text{Medelvärde av absorbansvärdet för referenskontrollen}}$$

Användaren bör beräkna en gräns mellan positiva och negativa prov som är specifik för den aktuella patientpopulationen. Resultatet från de patientpopulationer som medverkat vid Euro Diagnosticas kliniska studier indikerar följande gränser:

Absorbanskvot	Bedömning av resultatet
<0.95	Negativ
≥0.95 till ≤1.0	Gränsfall - ny analys bör genomföras och/eller ett nytt prov tas efter lämplig tid
>1.0	positiv

Kvantitativ analys

Avsätt medelvärdet för standardernas absorbans mot \log_{10} för standardkoncentrationerna (se tabellen nedan) på lämpligt millimeterpapper. Därefter kan koncentrationerna i kontroller och patientprov avläsas från standardkurvan. En typisk kurva visas nedan som ett exempel; den får inte användas för avläsning av resultat. Kurvpassning enligt principen om 4 logistiska parametrar (4PL), log/logit, lin/linit eller spline kan också ge godtagbart resultat.

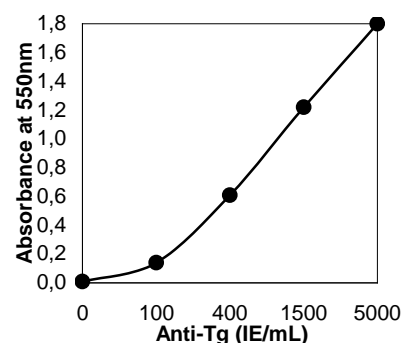
Prov vilkas absorbans ligger högre än absorbansen hos standardprov 5 (5000 IE/mL) ligger utanför analysområdet och bör rapporteras som >5000 IE/mL. En ny analys bör göras med anpassning av utspädningen.

OBS: Som vid alla analyser av antikropps-koncentrationer är det de facto antikropparnas aktivitet i provet som mäts, snarare än deras koncentration. Aktiviteten kan påverkas av flera faktorer, exempelvis aviditeten.

Standard Concentrations

Standard Number	Concentration IE/mL
1	0
2	100
3	400
4	1500
5	5000

Typical Standard Curve



KVALITETSSÄKRING

Se till att plattavläsaren får föreskrivet underhåll och kalibreras enligt tillverkarens anvisningar. Kontrollera att rätt våglängd används.

Användarna bör se till att de är helt införstådda med analysanvisningarna, särskilt avsnittet Varningar och försiktighetsmått, liksom med beskrivningen av hantering och förfarande. Användarna bör kunna visa att de kan uppnå värden i fråga om precision och rapporterbara intervall för analysresultaten som kan jämföras med tillverkarens uppgifter, innan resultat från analys av patientproven rapporteras. Det är lämpligt att dubblera förutspädda positiva och negativa kontroller vid alla analyser, för att därigenom kunna kontrollera testproceduren. Sätt den användningsklara referenskontrollen i duplikat vid alla kvalitativa analyser.

Förutsatt att de precisionsvärden som tillverkaren uppger kan uppnås, måste varje analys förkastas där någon av kontrollerna faller utanför specifikationerna nedan. Sådana analysresultat skall inte rapporteras. Användaren kan upprepa analysen efter granskning av sina rutiner, eller kontakta leverantören/tillverkaren. Vid förnyad analys skall nya spädningar göras av respektive kontroller och patientprov. Laboratorierna kan vilja inkludera egna kontroller vid varje analys. Sådana kontroller skall förvaras vid -20° C eller lägre och bör inte omfrysas när de tinats. Konserveringsmedel som natriumazid i koncentrationen 0,1% (m/v) påverkar inte analysresultaten.

De nivåer av analyt som identifierats för olika sjukdomar är de som tillverkaren har fastställt för givna populationer, och behöver inte med säkerhet motsvara värden som anges i litteraturen. Prevalens, samband med specifika sjukdomar, referensintervall och lämpliga gränsvärden bör beräknas för den speciella patientpopulation som användaren betjänar.

Specifikationer för kontrollprovets absorptionskvot

Analystyp	Specifikationer			
Kvalitativ (kvoter)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; width: 60%;">Absorbans positiv kontroll</td> <td rowspan="2" style="width: 40%; text-align: center;">se etiketten</td> </tr> <tr> <td>Absorbans referenskontroll</td> </tr> </table>	Absorbans positiv kontroll	se etiketten	Absorbans referenskontroll
	Absorbans positiv kontroll	se etiketten		
Absorbans referenskontroll				
Kvantitativ	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="border-bottom: 1px solid black; width: 60%;">Absorbans negativ kontroll</td> <td rowspan="2" style="width: 40%; text-align: center;"><0.95</td> </tr> <tr> <td>Absorbans referenskontroll</td> </tr> </table>	Absorbans negativ kontroll	<0.95	Absorbans referenskontroll
	Absorbans negativ kontroll	<0.95		
Absorbans referenskontroll				
	På etiketten till den positiva kontrollen anges godtagbart förväntat intervall (IE/mL)			
	Den negativa kontrollens värde skall vara lägre än 100 IE/mL			

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

207 serumprover från asymtomatiska till synes friska givare bestående av ungefär lika antal män och kvinnor mellan 17 och 68 år, utan autoimmun sjukdomshistoria, analyserades för anti-Tg-antikroppar av IgG-typ. Tre prov gav resultaten 582, 997 och 1396 IE/mL. Dessa tre prov exkluderades från beräkningen av normalgränsen. Med användning av medelvärdet av 204 prover plus 2,5 standardavvikelse, fastställdes referensområdet till <100 IE/mL. 195/204 (95,6%) av denna population gav värden <100 IE/mL. Fördelningen av de 4,4% som gav värden >100 IE/mL ges nedan.

Referensmätområdet för asymtomatiska, friska individer etablerades som:

<i>Referensintervall</i>
Negativa prover ≤ 100 IE/mL
Positiva prover > 100 IE/mL

Antal prover	anti-Tg IE/mL	% Asymtomatisk population (n=204)
6	100-119,9	2,9
-	120-139,9	-
2	140-159,9	0,97
1	160-179,9	0,48

Med användning av detta referensområde erhöles autoantikroppsfordelningen för 116 prover från patienter med tyreoidesjukdom. Den diagnostiska informationen baseras på den förmodade diagnosen som uppgetts av laboratorerna som tillhandahöll proven. Patienter som testats positiva för Paul Bunnell viraemia är också inkluderade. Fördelningen av resultaten ges i följande tabell.

Förmodad diagnos	Intervall i IE/mL			
	0-100	>100-1000	>1000-5000	> 5000
Graves/tyreotoxikos (n=59)	35	19	5	0
Hashimotos struma/tyreoid autoimmun sjukdom (n=33)	25	8	0	0
Hypotyreos (n=24)	11	10	3	0
Paul-Bunnells viremi (n=31)	30	1	0	0

PRESTANDA

Spädningsegenskaper

Fyra spädningar av två patientprover analyserades med två separata Anti-Tg kitsatser. Medelvärden i IE/mL samt beräknade procentuell återvinning anges i tabell nedan.

Tabell 3: Spädningsegenskaper

Prov	Spädning	Medelvärde IE/mL	%-Återvinning
1	A	1 564	100
	A/2	774	99
	A/4	416	106
	A/8	232	119
2	A	1 265	100
	A/2	681	108
	A/4	358	113
	A/8	199	126

Korrelation med agglutinationsanalyser

Tvåhundra nittionio (299) patienter testades med DIASTAT[®] Anti-Tg Assay och en kommersiellt tillgänglig anti-Tg-agglutinationsanalys. 28 av dessa prover visade en gränfallsnivå i agglutinationsanalysen och uteslöts från följande korrelation.

		DIASTAT [®] Anti-Tg	
		+	-
Agglutination anti-Tg	+	53	5*
	-	12*	201

Total korrelation mellan analyserna var 93,7 % (n=271).

De 5* och 12* avvikande proverna testades med två kommersiellt tillgängliga anti-Tg-ELISA-test.

De 5 EIA-negativa/agglutinationspositiva proverna var negativa i båda kit.

Av de 12 EIA-positiva/agglutinationsnegativa proverna var 10 positiva i ett ELISA-test, och 4 positiva i det andra ELISA-testet.

Korrelation med ELISA Anti-Tg analys

En jämförande studie utfördes med en annan anti-Tg-ELISA med 169 patientprover.

Följande resultat erhålls

		DIASTAT [®] Anti-Tg	
		+ ve	- ve
ELISA anti-Tg	+ ve	79	6
	- ve	1	83

Total överensstämmelse var 95.9%. De sju avvikande proverna testades i ännu ett ELISA-kit. DIASTAT-resultaten konfirmerades i 6/7 (85.7%).

Precision

- Precision inomserie** fastställdes genom test av fyra olika kontroller i fyra replikat, i totalt 12 analyser, med tre operatörer och tre kitsatser.

Kontroll	Koncentration IE/mL	RMS % CV
1	195	5,28
2	609	7,82
3	752	6,40
4	1 755	10,50

- Precision mellanserie** fastställdes genom test av fyra olika kontroller i fyra replikat, i totalt 12 analyser, med tre operatörer och tre kitsatser.

Kontroll	Koncentration IE/mL	SD	% CV
1	195	20,67	10,6
2	609	54,20	8,9
3	752	59,41	7,9
4	1 755	254,50	14,5

B E G R Ä N S N I N G A R

1. Även om förekomst av hög titer av antikroppar mot tyreoglobulin indikerar tyreoid autoimmun sjukdom måste uppgifterna bedömas tillsammans med andra kliniska fynd och laboratorieresultat.
2. Vissa individer kan ha hög halt av anti-Tg-antikroppar, med lite eller inga symptom på klinisk sjukdom. Å andra sidan kan vissa patienter med fastställd klinisk sjukdom ha odetekterbara nivåer av denna antikropp.
3. Låg titer av anti-Tg-antikroppar kan detekteras hos uppenbart friska individer. Dessa resultatets kliniska betydelse har ej fastställts.
4. Om omtestning av patient eller om efterföljande prover krävs, rekommenderar vi att samma typ av prov (serum eller plasma) används.

R E F E R E N C E S

1. Kohno Y, et al. *J Clin Endocr Met*, **67** No. 5, 899-907, 1988.
2. Rapaport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
3. Dorrein Y, et al. *Biochem Biophys Acta*, **2**, 454, 1948.
4. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
5. Delespesse G, et al. *Horm Metabl Res*, **8**, 50-54, 1976.
6. Amino N, et al. *J Clin Endoc Metab*, **53**, 113-116, 1981.
7. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986.
8. Scherbaum WA, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Supple. 281, 325-329, 1987.
9. Shimijo N, et al. *Clinica Acta*, **163**, 41-49, 1987.

S A M M A N F A T T N I N G A V F Ö R F A R A N D E T

1. Späd prov, positiv och negativ kontroll 1:101. Späd ej standarder eller referenskontroll.
2. Tillsätt 100 µL referenskontroll eller standarder i duplikat. Tillsätt 100 µL utspätt prov, utspädd positiv kontroll och negativ kontroll till respektive brunnar på mikrobrunnstripen.
3. Inkubera vid rumstemperatur (18-25° C) i 60±5 minuter.
4. Tvätta stripsen 5 gånger.
5. Tillsätt 100 µL IgG-konjugat i varje brunn.
6. Inkubera vid rumstemperatur (18-25° C) i 30±5 minuter.
7. Tvätta stripsen 5 gånger.
8. Tillsätt 100 µL substratlösning i varje brunn.
9. Inkubera strips vid rumstemperatur (18-25° C) i 30±5 minuter.
10. Tillsätt 100 µL stopplösning i varje brunn.
11. Avläs absorbans vid 550 nm.

	Batch code / Code du lot / Código de lote / Chargenbezeichnung / Codice del lotto / Satsnummer
	Catalogue number/ Référence du catalogue / Número de catálogo / Bestellnummer / Numero di catalogo / Katalognummer
	Use by/ Utiliser jusque / Fecha de caducidad / Verwendbar bis / Utilizzare entro / Hållbar till
	Temperature limitation/ Limites de temperature / Limite de temperatura / Zulässiger Temperatur-bereich / Limite di temperatura / Temperaturgränser
	Biological risks/ Risques biologiques / Riesgo biológico/Biogefährdung /Rischio biologico / Biologisk risk
	Consult instructions for use/ Consulter les instructions d'utilisation / Consulte las instruccione de uso/ Gebrauchsanweisung beachten / Consultare le istruzioni per l'uso / Se bruksanvisning
	In Vitro Diagnostic Medical Device/ Dispositif medical de diagnostic in vitro / Producto sanitario para diagnóstico in vitro / In Vitro Diagnostikum / Dispositivo medico-diagnostico in vitro / In vitro diagnostika
	Manufacturer/ Fabricant / Fabricante / Hersteller / Fabbicante / Tillverkare
	Contains sufficient for <n> tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para <n> ensayos/ Ausreichend für "n" Ansätze / Conteúdo suficiente para <n> ensaios / Innehållet tillräckligt för n tester
	Warning / Attention / Atención / Achtung / Attenzione / Varning
	Conformity to 98/79/EC on In Vitro Diagnostic Medical Device Directive / Conformément à la directive européenne 98/79/CE relative aux dispositifs médicaux de diagnostic in vitro / La conformidad con la Directiva 98/79/CE sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro / Konform mit Richtlinie 98/79/EG zu In-vitro- Diagnostika / Conformità alla direttiva 98/79/CE relativa ai dispositivi medico- diagnostici in vitro / Överensstämmer med direktiv 98/79/EG för medicintekniska produkter.

CONJ	Conjugate/ Conjugué / Conjugado / Konjugat / Conjugato / Konjugat
SUBS	Substrate/ Substrat / Substrato / Substrat / Substrato / Substrat
SOLN STOP	Stop solution/ Solution d'Arrêt / Solución de Parada / Stopplösung/ Soluzione bloccante / Stopplösning
BUF WASH 16 x	Wash buffer concentrate (16 X)/ Concentré tampon de (16X lavage)/ Concentrado de Búfer de lavado (16 X) / Washpuffer-Konzentrat (16 X) / Tampone di lavaggio concentrato (16 X) / Tvättbuffert koncentrat (16 X)
Ag	Tg-coated wells and strip holder / Cupules enduites de Tg et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con Tg / Tg-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di Tg e supporto per strip /Tg-klädda brunnar och striphållare
DIL SPE 5 X	Sample Diluent Concentrate (5 X) / Concentré diluent pour échantillons (5 X)/ Concentrado de Diluente de Muestra (5 X) / Probendiluens Konzentrat / Diluente per campioni concentrato (5 X) / Provspädningsbuffert koncentrat (5 X)
CAL X	Anti-Tg Standards 1-5/ Étalons anti-Tg 1-5 / Estandares Anti-Tg 1-5 / Anti-Tg Standards 1-5 / Standard anti-Tg 1-5 / Anti-Tg-standarder
CONTROL REF	Anti-Tg Reference Control/ Témoins de référence anti-Tg / Control de Referencia Anti-Tg / Anti-Tg Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-Tg / Anti-Tg referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positives / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

EURO DIAGNOSTICA AB
 Lundavägen 151, SE-212 24 Malmö, Sweden
 Phone: +46 40 53 76 00, Fax: +46 40 43 22 88
 E-mail: info@eurodiagnostica.com
 www.eurodiagnostica.com