

DIASTAT[®] Anti-Thyroid Peroxidase (TPO)

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-23-0121-07
January, 2014

DIASTAT[®] Anti-Thyroid Peroxidase (TPO)

English: page	2
Français: page	14
Español: página	27
Deutsch: Seite	39
Italiano: pagina	51
Svenska: sida.....	63

ENGLISH: INTENDED USE

The DIASTAT[®] Anti-Thyroid Peroxidase (anti-TPO) test is a quantitative/qualitative enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of the IgG class of autoantibodies specific for thyroid peroxidase in human serum or EDTA, lithium heparin, and sodium citrate 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





Autoimmune thyroid disorders encompass autoimmune destruction and stimulation; both states are associated with predominantly IgG local and circulating thyroid autoantibodies.

The presence of anti-thyroglobulin (Tg) autoantibodies in patients with Hashimoto's thyroiditis was first demonstrated in 1956 by Roitt et al¹ using gel diffusion precipitation. Trotter et al² and Roitt et al³ subsequently showed that many patients with advanced thyroiditis had antibodies for a thyroid antigen distinct from Tg. This was termed thyroid microsomal antigen (TMA). Considerable evidence indicates that TMA is antigenically related to thyroid peroxidase (TPO), a membrane-bound glycoprotein enzyme with an approximate mass of 101kD, whose in vivo function is the iodination of tyrosine in the synthesis of the thyroid hormones T3 and T4. TMA and TPO may be identical moieties⁴⁻⁸; cloning of human TPO gives further support to their close identity⁹. TPO autoantibodies may play a pathogenic role in destructive autoimmune thyroid diseases as they can fix complement and consequently induce cytolysis^{10,11}. Autoimmune reactivity to TPO is believed to be polyclonal, with autoantibodies recognising a minimum of six distinct determinants¹². Anti-TPO antibodies are found, often in conjunction with anti-thyroglobulin autoantibodies, in the majority of Hashimoto's Thyroiditis, Graves' disease and in cases of Primary Myxoedema. The relationship of autoimmune thyroid disease in pregnancy has been the subject of considerable interest, with the demonstration of TPO antibodies in most cases of post-partum thyroiditis¹³⁻¹⁶ and the association of thyroid autoantibodies with increased miscarriage risk¹⁷. Anti-TPO antibodies are found in other non-thyroid conditions, e.g. pernicious anaemia^{18,19}, diabetes mellitus^{20,21}, rheumatoid arthritis²², Addison's disease²¹ and Sjogren's Syndrome¹⁹. In addition, anti-TPO antibodies are detectable at low levels in 2-8% of apparently healthy individuals, particularly in the elderly and more often in women than in men, although the clinical significance of this is unclear

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The wells of the microtitre strips are coated with recombinant human TPO (rTPO) 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-TPO autoantibody can be estimated by interpolation from a dose-response curve based on Standards. The Standards are calibrated against NIBSC 66/387 thyroid microsomal antibody reference preparation.

KIT COMPONENTS

A	IgG Conjugate	1 × 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 × 15 mL	Mg ²⁺ , phenolphthalein monophosphate (PMP), buffer solution. Ready-to-use. Do not expose to light during storage.	
C	Stop Solution	1 × 15 mL	Sodium hydroxide, EDTA, carbonate buffer (pH >10). Ready-to-use.	
D	Wash Buffer Concentrate (16X)	3 × 25 mL	Borate buffer, 0.4% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
E	TPO-Coated Wells and Strip Holder	12 × 8 well microtitre strips	Coated with human recombinant TPO antigen, in a resealable foil pack with desiccant. Colour-coded RED . Individual wells can be broken off from each microtitre strip.	
F	Sample Diluent Concentrate (5X)	1 × 25 mL	Phosphate buffer, protein stabiliser, 0.5% (w/v) sodium azide. Dilute before use.	
1-5	Anti-TPO Standards	5 × 1.0 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide. 0, 8, 25, 125, 500 IU/mL. Ready-to-use.	
6	Anti-TPO Reference Control	1 × 1.5 mL	Human plasma, buffer, <0.1% (w/v) sodium azide.	
+/-	Positive Control Negative Control	1 × 0.2 mL 1 × 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 or EDTA, lithium heparin and sodium citrate 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 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. |

**Warning****C.**

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

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.

**Warning****D. and F.**

BUF	WASH	16X
DIL	SPE	5X

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 550 nm filter (540-565 nm is acceptable).
2. Precision pipettes to dispense 10 μ L, 100 μ L, 1 mL. Automatic pipette to dispense 100 μ L. Automatic pipette to dispense 200 μ L for manual washing, automatic plate washer optional.
3. Glass/plastic measuring cylinders: 1 \times 100 mL, 1 \times 400 mL.
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 Controls.

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	10 μ L	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).

A S S A Y P R O T O C O L

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 100 μ L 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 \pm 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 200 μ L diluted Wash Buffer. **Decant and blot after each wash step.**
6. Add 100 μ L IgG Conjugate 1 to each well.
7. Incubate 30 \pm 5 minutes at 18-25° C.
8. Repeat steps 4 and 5.
9. Add 100 μ L Substrate to each well.
10. Incubate 30 \pm 5 minutes at 18-25° C. **Do not decant.**
11. Add 100 μ L 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.

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:

<u>Absorbance Ratio</u>	<u>Result Interpretation</u>
<1.0	Negative
≥1.0	Positive

Quantitative Protocol

Plot the mean absorbance value of each Standard against log₁₀ 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), 5-parameter logistic (5PL), log/logit lin/linfit or spline curve fits are also satisfactory.

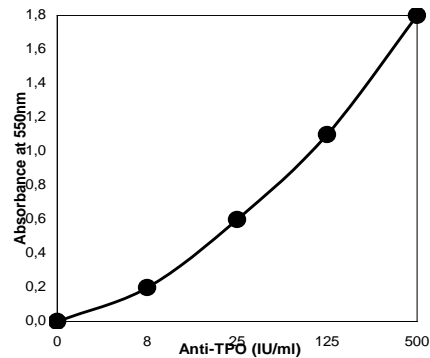
Samples with absorbances above Standard 5 (500 IU/mL) are outside the range of the assay, and should be reported as >500 IU/mL, diluted and re-assayed, correcting for this further dilution factor.

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	8
3	25
4	125
5	500

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 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.

Protocol	Specifications
Qualitative (ratios)	$\frac{\text{Positive Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}}$ see Positive Control label
	$\frac{\text{Negative Control Absorbance}}{\text{Reference Control Absorbance}} < 1.0$
Quantitative	See Positive Control label for acceptable expected range (IU/mL)
	Negative Control concentration <10 IU/mL

EXPECTED VALUES

172 serum samples from asymptomatic apparently healthy donors, with an age range of 21 – 51 years, comprising approximately equal numbers of males and females, were tested for the presence of anti-TPO autoantibodies using the DIASTAT test and a further commercially available device. Sixteen (7%) samples were positive in the further test device and were omitted from the calculation of the DIASTAT reference range. Of the remaining 156 results, 153 (98%) gave values of less than 10 IU/mL. On the basis of this data the suggested cut-off for the DIASTAT anti-TPO ELISA is less than 10 IU/mL. The reference range is suggested as a guideline only, and each laboratory should establish a reference range appropriate to their patient populations and clinical practice. Concentrations are expressed in units derived from standards calibrated against the NIBSC 66/387 thyroid microsomal antibody reference preparation.

Reference Range

<10 IU/mL = Negative

≥10 IU/mL = Positive

P E R F O R M A N C E D A T A

Concordance Study

The performance of the DIASTAT Anti-TPO test was compared with a commercially available test for the measurement of autoantibodies to TPO. A total of 377 samples were evaluated, encompassing a spectrum of thyroid-associated diseases and those from an asymptomatic population. The following results were obtained:

		Immunoassay anti-TPO	
		+ve	-ve
DIASTAT ANTI-TPO	+ve	169	9
	-ve	9	190

Co-positivity = 94.9%

Co-negativity = 95.5%

Overall agreement = 95.2%

Clinical Sensitivity

Clinical sensitivity was evaluated by testing 51 samples from patients diagnosed with Hashimoto's disease and 52 from patients with Graves' disease. Diagnosis was based on the laboratories' diagnostic criteria.

49/51 (96.1%) of the patients with Hashimoto's disease tested positive using DIASTAT Anti-TPO.

38/52 (73%) of the patients with Graves' disease tested positive using DIASTAT Anti-TPO. The distribution of the anti-TPO results in the normal, Graves and Hashimoto populations is given below..

Diagnosis	n	0-9.9 IU/mL	10-14.9 IU/mL	15-99.9 IU/mL	100-249.9 IU/mL	250-500 IU/mL
Normals	153	153 (100%)	0	0	0	0
Graves'	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimoto's	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

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	344.6	100
	A/2	163.2	95
	A/4	80.5	93
	A/8	41.7	97
2	A	449.8	100
	A/2	221.7	99
	A/4	102.7	91
	A/8	51.3	91

Imprecision

- Intra-assay imprecision** determined by testing three controls in 20 assays, using one operator and two kit batches.

Control	Mean Value IU/mL	RMS %CV
1	12.8	5.9%
2	88.0	4.5%
3	243.3	4.4%

- Inter-assay imprecision** determined by testing three controls in 20 assays, using one operator and two kit batches.

Control	Mean Value IU/mL	SD	%CV
1	12.8	1.0	7.6%
2	88.0	7.9	9.0%
3	243.3	25.5	10.5%

Lower Limit of Detection

The lower limit of detection, calculated as the mean of the zero standard plus two standard deviations, run in replicates of 20 in two kit batches, was calculated as 1.0 IU/mL.

Interferences

Haemolysate up to 4.0 mg/mL, bilirubin up to 0.2 mg/mL, intralipid up to 15 mg/mL and the presence of rheumatoid factor up to 200 IU/mL produced results within $\pm 10\%$ of the target value.

LIMITATIONS OF USE












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

REFERENCES

1. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. *Proc R Soc Med*, **50**, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. *Federation of European Biochemical Societies*, **190** No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. *J Endocrin Invest*, **9**, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. *J Clin Invest*, **79**, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Suppl. **281**, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. *J Clin Invest*, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. *Clin Exp Immun*, **45**, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. *Endocrine Revs*, **5**, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. *Immunology*, **64**, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **67**, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **58**, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. *Thyroid Today*, **16**, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. *Thyroid*, **9** No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. *Jama*, **264** No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. *European Journal of Endocrinol*, **141**, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. *Autoimmunity*, **9**, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. *European Journal of Endocrinol*, **139**, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl*, **281**, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986

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 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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / 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-peroxydase thyroïdienne (anti-POT) DIASTAT[®] est un dosage immunoenzymatique (méthode ELISA) pour la détection des auto-anticorps de la classe IgG spécifiques de la peroxydase thyroïdienne dans le sérum ou le plasma humain ou EDTA, l'héparine au lithium et le plasma au citrate de sodium. 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.

I N T R O D U C T I O N

Les affections thyroïdiennes auto-immunes comprennent la destruction et la stimulation autoimmunes; ces deux états sont associés à la présence prédominante d'auto-anticorps thyroïdiens circulants et locaux de la classe IgG.





La présence d'auto-anticorps anti-thyroglobuline (Tg) chez des patients avec une thyroïdite de Hashimoto a été démontrée pour la première fois en 1956 par Roitt et coll.1 en utilisant la précipitation et la diffusion sur gélose. Par la suite, Trotter et coll.2 et Roitt et coll.3 ont montré que de nombreux patients avec une thyroïdite à un stade avancé possédaient des anticorps pour un antigène thyroïdien distinct. Il a été appelé antigène microsomal thyroïdien (AMT). De nombreuses preuves indiquent que l'AMT est antigéniquement associé à la peroxydase thyroïdienne (POT), une enzyme glycoprotéinique fixée à la membrane avec une masse approximative de 101 kD, et dont la fonction in vivo est l'iodation de la tyrosine dans la synthèse des hormones thyroïdiennes T3 et T4. L'AMT et la POT pourraient être des portions de molécules identiques 4-8; le clonage de la POT humaine apporte une confirmation supplémentaire de leur proche identité 9. Les auto-anticorps dirigés contre la POT pourraient jouer un rôle pathogène dans les maladies thyroïdiennes auto-immunes destructives, car ils peuvent fixer le complément et induire ainsi la cytolysse 10,11. On pense que la réactivité auto-immune à la POT est polyclonale, les auto-anticorps reconnaissant au moins six déterminants bien distincts 12. Les anticorps anti-POT sont trouvés, souvent en même temps que les auto-anticorps antithyroglobuline, dans la majorité des cas de la maladie de Hashimoto et de la maladie de Graves, et dans des cas de myxoedème. Le lien avec la maladie thyroïdienne auto-immune durant la grossesse a soulevé beaucoup d'intérêt, avec la démonstration de la présence d'anticorps anti-POT dans la plupart des cas de thyroïdite post-partum 13-16 et de l'association des auto-anticorps thyroïdiens avec le risque accru de fausse couche 17. Les anticorps anti-TPO sont trouvés dans des conditions autres que thyroïdiennes, telles l'anémie pernicieuse 18,19, le diabète sucré 20,21, la polyarthrite rhumatoïde 22, la maladie d'Addison 21 et le syndrome de Sjogren 19. De plus, les anticorps anti-POT sont présents à taux faibles chez 2 à 8 % des individus en bonne santé, en particulier chez les personnes âgées, et plus souvent chez les femmes que chez les hommes, bien que l'importance clinique ne soit pas très claire.

P R I N C I P E D U D O S A G E

Les cupules des bandes de microtitrage sont enduites de POT humaine recombinante (POTr). Durant la première incubation, des auto-anticorps spécifiques présents dans le sérum ou plasma dilué se fixent à la surface enduite d'antigène. Les cupules sont ensuite lavées pour éliminer tous 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-TPO peut être estimée par interpolation à partir d'une courbe dose-effet basée sur les Etalons. Les Etalons sont étalonnés par rapport à la préparation témoin d'anticorps microsomaux thyroïdiens NIBSC 66/387.

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 POT et Portebandes	12 bandes de microtitrage à 8 cupules	Enduites d'antigène POT recombinante humaine, dans une poche en aluminium refermable contenant un desséchant. Codées ROUGE . 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	Étalons Anti-POT	5 x 1.0 mL	Plasma humain, tampon, azoture de sodium à <0,1% (p/v). 0, 8, 25, 125, 500 UI/mL. Prêt à l'emploi	
6	Témoin de référence Anti-POT	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 nécessaire a été ouvert et réutilisé à trois occasions durant une période de trois mois et cela n'a pas affecté sa performance

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-plaque 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 ou de plasma EDTA, à l'héparine de lithium ou au citrate de sodium; 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 nclus 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 : 1x100 mL, 1x400 mL.
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	10µL	1 mL de diluant dilué 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'Etalons/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).

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

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

Protocole qualitati

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

<1.0

≥1.0

Interprétation des résultats

Négatif

Positif

Protocole quantitative

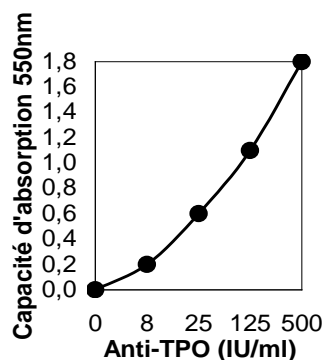
Sur du papier millimétré, tracer la valeur d'absorption de chaque Etalon en fonction de la concentration Etalon log₁₀ (voir tableau ci-dessous). Les concentrations des Témoins et des échantillons peuvent alors être lues sur la courbe d'étalonnage ; à titre de référence, une courbe type est illustrée 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'Étalon 5 (500 UI/mL) dépassent les limites du dosage, et ils doivent être considérés comme > 500 UI/mL, être dilués et re-analysés, en apportant la rectification nécessaire pour ce facteur de dilution supplémentaire. NB: Comme avec tout dosage mesurant les 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 Etalons

Standard Number	Concentration UI/mL
1	0
2	8
3	25
4	125
5	500

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 > -20°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
	$\frac{\text{Absorption du Témoin négatif}}{\text{Absorption du Témoin de référence}}$	<1.0
Quantitatif	Se référer à l'étiquette du Témoin positif pour les limites attendues acceptables (UI/mL)	
	Concentration du témoin négatif <10 UI/mL	

VALEURS ATTENDUES

172 échantillons sériques provenant de donneurs apparemment en bonne santé et asymptomatiques, d'un âge compris entre 21 et 51 ans, et un nombre plus ou moins égal d'hommes et de femmes, ont été analysés pour voir s'ils contenaient des auto-anticorps anti-POT au moyen du test DIASTAT ainsi que d'un autre système de test vendu dans le commerce. 16 (7 %) échantillons ont obtenu un résultat positif dans l'autre système de test et ils ont été omis lors du calcul des limites de référence du test DIASTAT. Parmi les 156 résultats restants, 153 (98 %) ont donné des valeurs inférieures à 10 UI/mL. En vue de ces données, le seuil suggéré pour le test DIASTAT anti-POT ELISA est de 10 UI/mL. Ces limites de référence ne sont données qu'à titre de guide et chaque laboratoire doit déterminer les limites de référence qui conviennent à leurs populations de patients et à pratique clinique. Les concentrations sont exprimées en unités dérivées des étalons étalonnés par rapport à la préparation témoin d'anticorps microsomaux thyroïdiens NIBSC 66/387.

Limites de référence

<10 UI/mL = Négatif

≥10 UI/mL = Positif

DONNEES RELATIVES A LA PERFORMANCE**Etude de concordance**

La performance du test anti-POT DIASTAT a été comparée à celle d'un système de test pour mesurer les auto-anticorps anti-POT vendu dans le commerce. Un total de 377 échantillons, provenant de patients avec un spectre de maladies associées à la thyroïde et d'une population asymptomatique, ont été évalués. Les résultats suivants ont été obtenus.

DIASTAT ANTI-POT	Immunodosage anti-POT	
	+ve	-ve
+ve	169	9
-ve	9	190

Co-positivité = 94.9%

Co-négativité = 95.5%

Concordance générale = 95.2%

Sensibilité clinique

La sensibilité clinique a été évaluée en testant 51 échantillons provenant de patients diagnostiqués comme ayant la maladie de Hashimoto et de 52 patients avec la maladie de Basedow-Graves. Le diagnostic reposait sur les critères diagnostiques des laboratoires. 49/51 (96,1 %) des patients avec la maladie de Hashimoto ont obtenu un résultat positif. 38/52 (73 %) des patients avec la maladie de Basedow-Graves ont obtenu un résultat positif. La répartition des résultats relatifs aux anticorps anti-TPO dans la population normale, la population avec la maladie de Basedow-Graves et la population avec la maladie de Hashimoto est donnée ci-dessous.

Diagnostic	n	0-9.9 UI/mL	10-14.9 UI/mL	15-99.9 UI/mL	100-249.9 UI/mL	250-500 UI/mL
Normale	153	153 (100%)	0	0	0	0
Basedow-Graves	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimotos	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

Caractéristiques de la dilution

Quatre dilutions de deux échantillons provenant de patients ont été analysées avec deux lots de nécessaires. Le tableau suivant indique les valeurs moyennes obtenues et le pourcentage récupéré rectifié en fonction de la dilution.

Echantillon	Dilution	Valeur moyenne UI/mL	% récupéré rectifié en fonction de la dilution
1	A	344.6	100
	A/2	163.2	95
	A/4	80.5	93
	A/8	41.7	97
2	A	449.8	100
	A/2	221.7	99
	A/4	102.7	91
	A/8	51.3	91

Imprécision

- Imprécision intra-dosages** déterminée en testant trois témoins dans 20 dosages, en utilisant un laborantin et deux lots de nécessaires.

Témoin	Valeur moyenne UI/mL	Carré moyen de la racine %CV
1	12.8	5.9%
2	88.0	4.5%
3	243.3	4.4%

2. **Imprécision inter-dosages** déterminée en testant trois témoins dans 20 dosages, en utilisant un opérateur et deux lots de nécessaires.

Témoin	Valeur moyenne UI/mL	ET	%CV
1	12.8	1.0	7.6%
2	88.0	7.9	9.0%
3	243.3	25.5	10.5%

Limite inférieure de détection

La limite inférieure de détection, calculée comme la moyenne de l'étalon zéro plus deux écarttypes, après analyse en double exemplaire dans vingt dosages, était de 1,0 UI/mL.

Interférences

Un maximum d'hémolysat de 4,0 mg/mL, de bilirubine de 0,2 mg/mL, d'intralipides (ou lipides) de 15 mg/mL et de facteur rhumatoïde de 200 UI/mL a produit des résultats différant de +/- 10 % de la valeur cible.

RESTRICTIONS D'UTILISATION












1. Bien que la présence de taux élevés d'anticorps dirigés contre la peroxydase thyroïdienne 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-POT 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-POT 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, hépariné ou citré) doit être utilisé durant toute la période d'étude

REFERENCES

1. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. *Proc R Soc Med*, **50**, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. *Federation of European Biochemical Societies*, **190** No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. *J Endocrin Invest*, **9**, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. *J Clin Invest*, **79**, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Suppl. **281**, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. *J Clin Invest*, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. *Clin Exp Immun*, **45**, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. *Endocrine Revs*, **5**, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. *Immunology*, **64**, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **67**, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **58**, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. *Thyroid Today*, **16**, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. *Thyroid*, **9** No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. *Jama*, **264** No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. *European Journal of Endocrinol*, **141**, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. *Autoimmunity*, **9**, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. *European Journal of Endocrinol*, **139**, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl*, **281**, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986

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 d'IgG 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 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 instrucciones 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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / 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-tiroperoxidasa (anti-TPO) DIASTAT[®] es un análisis inmunosorbente con anticuerpo ligado a enzima (ELISA) cuantitativo/cualitativo para la detección de autoanticuerpos clase IgG específicos para la tiroperoxidasa en suero humano o EDTA, heparina de litio, citrato de sodio en plasma. 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





Los trastornos tiroideos autoinmunes conllevan la estimulación y la destrucción autoinmune; ambos estados se asocian con autoanticuerpos tiroideos circulantes y locales, predominantemente IgG.

La presencia de autoanticuerpos anti-tiroglobulina (Tg) en pacientes con tiroiditis de Hashimoto fue demostrada, por primera vez, en 1956 por Roitt y cols.1, utilizando la precipitación por difusión de gel. Trotter y cols.2 y Roitt y cols.3 demostraron posteriormente, que muchos pacientes con tiroiditis en fase avanzada presentaban anticuerpos para un antígeno tiroideo distinto. Éste recibió el nombre de antígeno microsomal tiroideo (TMA). Existen considerables evidencias de que el TMA está relacionado antigénicamente con la peroxidasa tiroidea (TPO), una enzima glicoproteínica ligada a la membrana con una masa aproximada de 101kD, cuyo funcionamiento in vivo consiste en la yodación de la tirosina en la síntesis de las hormonas tiroideas T3 y T4. El TMA y la TPO pueden ser mitades idénticas4-8; la clonación de la TPO humana sustenta aún más esta identidad similar9. Los autoanticuerpos TPO pueden desempeñar un rol patogénico en las enfermedades tiroideas autoinmunes destructivas, ya que pueden fijar el complemento y, por consiguiente, inducir citolisis 10,11. Se piensa que la reactividad autoinmune a la TPO es policlonal, reconociendo los autoanticuerpos un mínimo de seis determinantes distintos 12. Los anticuerpos anti-TPO se hallan, frecuentemente junto con autoanticuerpos anti-tiroglobulina, en la mayoría de las Tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves y en casos de Mixoedema Primario. La relación de la enfermedad tiroidea autoinmune en el embarazo ha sido tema que ha despertado un considerable interés, con la demostración de anticuerpos TPO en la mayoría de los casos de tiroiditis postparto13-16 y la asociación de autoanticuerpos tiroideos con un mayor riesgo de aborto 17. Los anticuerpos anti-TPO se hallan en otras enfermedades no relacionadas con el tiroides, por ejemplo, la anemia perniciosa18,19, la diabetes mellitus 20,21, la artritis reumatoidea 22, la enfermedad de Addison 21 y el Síndrome de Sjogren19. Además, los anticuerpos anti-TPO son detectables en niveles bajos en al 2 a 8% de los individuos aparentemente sanos, especialmente en los ancianos y, más frecuentemente en mujeres que en hombres, aunque el significado clínico es poco claro.

PRINCIPIOS DEL ANÁLISIS

Los vasos de las bandas de microtitulación se recubren con TPO humana recombinante (rTPO). Durante la primera incubación, los autoanticuerpos específicos en plasma o suero diluido se fijan a la superficie recubierta con 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-TPO puede calcularse por interpolación a partir de una curva dosisrespuesta basada en los Estándares. Los Estándares se calibran en comparación con la preparación de referencia de anticuerpo microsomal tiroideo NIBSC 66/387.

COMPONENTES DEL K I T

A	Conjugado 1 IgG	1 x 15 mL	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 15 mL	Mg ²⁺ , monofosfato de fenoltaleína (PMP), solución de búfer. Listo para su uso. No exponer a la luz durante el almacenamiento.	
C	Solución de Parada	1 x 15 mL	Hidróxido de sodio, EDTA, búfer carbonatado (pH >10). Listo para su uso.	
D	Concentrado de Búfer de Lavado	3 x 25 mL	Búfer boratado, 0,4% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
E	Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO	12 x 8 bandas de microtitulación de vasos	Coated with human recombinant TPO antigen, in a resealable foil pack with desiccant. Colour-coded RED . Individual wells can be broken off from each microtitre strip.	
F	Concentrado de Diluyente de Muestra (5X)	1 x 25 mL	Búfer fosfatado, estabilizador de proteínas, 0,5% (c/v) azida sódica. Diluir antes de usar.	
1-5	Estándares Anti-TPO	5 x 1.0 mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. 0, 8, 25, 125, 500 UI/mL. Listo para su uso	
6	Control de Referencia Anti-TPO	1 x 1.5 mL	Plasma humano, búfer, <0,1% (c/v) azida sódica. Listo para su uso.	
+/-	Control Positivo Control Negativo	1x 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 su eficacia Handling and Procedural Notes

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 de placas está adaptado para su utilización 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 o EDTA, heparina de litio, citrato de sodio en plasma; no utilizar con 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 comprobado mediante análisis aprobados por la FDA para el antígeno de superficie de la hepatitis B, el VHC, el antígeno VIH y los anticuerpos VIH, 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 μ L, 100 μ L, 1 mL. Pipeta automática para dispensar 100 μ L. Pipeta automática para dispensar 200 μ L para el lavado manual; lavador automático de placa opcional.
3. Cilindros de medición de vidrio/plástico: 1x100 mL, 1x400 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 μ L	1 mL de Diluyente de Muestra diluido

Los vasos de microtitulación se suministran en bandas de ocho. 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).

PROTOCOLO DEL ANÁLISIS

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 Control de Referencia/Estándares por duplicado, Controles Negativos y Positivos 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 a 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>
<1.0	Negativo
≥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 cuadrículado 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.

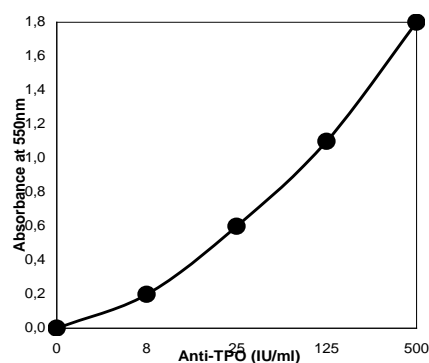
Las muestras con absorbencias superiores al Estándar 5 (500 UI/mL) quedan fuera del rango del análisis, y deben señalarse como corrección del factor de dilución >500 UI/mL, diluido y nuevamente analizado.

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

Concentraciones de Estándares

Número de Estándar	Concentración UI/mL
1	0
2	8
3	25
4	125
5	500

Curva Típica de Estándares



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 Negativos y Positivos 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 logra satisfacer las especificaciones de tasa de Control que aparecen a continuación, esto anula el análisis y no deben proporcionarse los resultados del 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)	$\frac{\text{Absorbancia de Control Positivo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}}$ Véase etiqueta de Control Positivo
	$\frac{\text{Absorbancia de Control Negativo}}{\text{Absorbancia de Control de Referencia}} < 1.0$
Cuantitativo	Véase etiqueta de Control Positivo para el rango previsto aceptable (UI/mL)
	Concentración de Control Negativo <10 UI/mL

VALORES PREVISTOS

A 172 muestras de suero de donantes asintomáticos, aparentemente sanos, con edades comprendidas entre los 21 y los 51 años y que abarcaban una proporción aproximadamente similar de hombres y de mujeres, se les realizó un análisis para verificar la presencia de autoanticuerpos anti-TPO utilizando la prueba DIASTAT y otro dispositivo comercialmente disponible. 16 (7%) muestras dieron valores positivos en el otro dispositivo de prueba y fueron eliminadas del cálculo del Rango de Referencia DIASTAT. De los 156 resultados restantes, 153 (98%) dieron valores inferiores a 10 IU/mL. Basándose en estos datos, el límite para el ELISA anti-TPO DIASTAT es 10 IU/mL. Este Rango de Referencia sólo debe considerarse como valor guía y cada laboratorio deberá determinar un Rango de Referencia apropiado para sus poblaciones de pacientes y prácticas clínicas. Las concentraciones se expresan en unidades derivadas de los estándares calibrados en comparación con la preparación de referencia del anticuerpo microsomal tiroideo NIBSC 66/387

<p><i>Rango de Referencia</i> <10 UI/mL = Negative ≥10 UI/mL = Positive</p>
--

DATOS SOBRE EL RENDIMIENTO

Estudio sobre la Concordancia

Se comparó el rendimiento de la prueba anti-TPO DIASTAT con una prueba comercialmente disponible para la medición de los autoanticuerpos a TPO. Se evaluó un total de 377 muestras, que abaracaban un espectro de enfermedades asociadas con el tiroides y de población asintomática. Se obtuvieron los siguientes resultados:

		Inmunoensayo anti-TPO	
		+ve	-ve
ANTI-TPO DIASTAT	+ve	169	9
	-ve	9	190

Co-positividad = 94.9%

Co-negatividad = 95.5%

Concordancia global = 95,2 % (n=377)

Sensibilidad Clínica

Se evaluó la Sensibilidad Clínica comprobando 51 muestras de pacientes con diagnóstico de enfermedad de Hashimoto y 52 muestras de pacientes con enfermedad de Graves. El diagnóstico se basó en los criterios diagnósticos de los laboratorios.

49/51 (96,1%) de los pacientes con enfermedad de Hashimoto tuvieron un resultado de la prueba positivo.

38/52 (73%) de los pacientes con enfermedad de Graves tuvieron un resultado de la prueba positivo.

A continuación se proporciona la distribución de los resultados anti-TPO en las poblaciones normal, con enfermedad de Graves y de Hashimoto.

Diagnóstico	n	0-9.9 UI/mL	10-14.9 UI/mL	15-99.9 UI/mL	100-249.9 UI/mL	250-500 UI/mL
Normals	153	153 (100%)	0	0	0	0
Graves	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimoto	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

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 UI/mL	Porcentaje de Recuperación %
1	A	344.6	100
	A/2	163.2	95
	A/4	80.5	93
	A/8	41.7	97
2	A	449.8	100
	A/2	221.7	99
	A/4	102.7	91
	A/8	51.3	91

1. **Imprecisión en el análisis**, determinada mediante la prueba de tres controles en 20 análisis, utilizando uno operador y dos lotes de kits.

Control	Valor Promedio UI/mL	Raíz Cuadrada Promedio %CV
1	12.8	5.9%
2	88.0	4.5%
3	243.3	4.4%

2. **Imprecisión entre análisis**, determinada mediante la prueba de tres controles en 20 análisis, utilizando uno operador y dos lotes de kits.

Control	Valor Promedio UI/mL	SD	%CV
1	12.8	1.0	7.6%
2	88.0	7.9	9.0%
3	243.3	25.5	10.5%

Límite de Detección Inferior

Se calculó que el límite de detección inferior, calculado como el promedio del estándar cero más dos desviaciones estándar en replicados de 20 en dos lotes de kits, era de 1,0 UI/mL.

Interferencias

El hemolizado hasta 4,0 mg/mL, la bilirrubina hasta 0,2 mg/mL, los intralípidos (o lípidos) hasta 15 mg/ml y la presencia de factor reumatoide hasta 200 UI/mL dieron resultados en +/- 10 % del valor diana.

LIMITACIONES DE USO












1. Aunque la presencia de niveles elevados de anticuerpos a la tiroperoxidasa es indicativa de enfermedad autoinmune tiroidea, hay que considerar los datos a la luz de otros hallazgos clínicos y de laboratorio.
2. Algunas personas pueden presentar niveles elevados de anticuerpos anti-TPO, con escasas o ninguna evidencia de enfermedad clínica. Por el contrario, algunos pacientes con enfermedad autoinmune tiroidea pueden tener niveles indetectables de estos anticuerpos.
3. Se pueden encontrar niveles anti-TPO bajos en individuos aparentemente sanos. El significado clínico de esta información es, en la actualidad, poco claro.
4. 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 heparina) durante todo el período del estudio

REFERENCIAS

1. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. *Proc R Soc Med*, **50**, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. *Federation of European Biochemical Societies*, **190** No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. *J Endocrin Invest*, **9**, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. *J Clin Invest*, **79**, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Suppl. **281**, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. *J Clin Invest*, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. *Clin Exp Immun*, **45**, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. *Endocrine Revs*, **5**, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. *Immunology*, **64**, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **67**, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **58**, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. *Thyroid Today*, **16**, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. *Thyroid*, **9** No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. *Jama*, **264** No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. *European Journal of Endocrinol*, **141**, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. *Autoimmunity*, **9**, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. *European Journal of Endocrinol*, **139**, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl*, **281**, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986

RESUMEN DEL PROTOCOLO

1. Diluir muestras y Controles Positivos y Negativos 1:101. No diluir los Estándares ni el Control de Referencia.
2. Añadir 100µL de Estándares/Control de Referencia por duplicado, muestras y Controles Negativos y Positivos prediluidos en los vasos referenciados de la banda de microtitulación.
3. Incubar 60 ± 10 minutos a 18-25° 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° C.
7. Lavar las bandas 5 veces.
8. Añadir 100µL de Substrato a cada vaso.
9. Incubar 30 ± 5 minutos a 18-25° 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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / 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-Schilddrüsenperoxidase (Anti-TPO)-Test ist ein quantitativer/qualitativer Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) für den Nachweis von Autoantikörpern der IgG-Klasse, die spezifisch für die Schilddrüsenperoxidase in Humanserum oder EDTA, Lithium-Heparin und Natriumzitratplasma 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





Autoimmune Schilddrüsenerkrankungen umfassen die autoimmune Zerstörung und Stimulation; beide Zustände sind mit vorwiegend lokalen und zirkulierenden IgG-Schilddrüsen-Autoantikörpern verbunden.

Das Auftreten von Anti-Thyroglobulin-Autoantikörpern (Tg) bei Patienten mit Hashimoto-Thyroiditis wurde erstmals 1956 von Roitt et al 1 unter Verwendung der Geldiffusionspräzipitation nachgewiesen. Trotter et al 2 und Roitt et al 3 zeigten später, daß viele Patienten mit fortgeschrittener Thyroiditis Antikörper gegen ein bestimmtes Schilddrüsenantigen besitzen. Es wurde als thyroidales mikrosomales Antigen (TMA) bezeichnet. Es gibt zahlreiche Beweise dafür, daß das TMA eine antigene Verwandtschaft zur Schilddrüsenperoxidase (TPO), einem membrangerundenen Glycoprotein-Enzym mit einer Masse von ca. 101 kD aufweist, dessen Aufgabe in vivo in der Jodierung von Tyrosin bei der Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 besteht. TMA und TPO können identische Teile⁴⁻⁸ sein; das Klonen von humanem TPO unterstreicht ihre enge Identität⁹. TPO-Autoantikörper können eine pathogenetische Rolle bei destruktiven autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen spielen, da sie Komplement fixieren und folglich Zytolyse induzieren können^{10,11}. Die autoimmune Reaktivität auf TPO wird als polyclonal angesehen, wobei die Autoantikörper mindestens sechs verschiedene Determinanten erkennen können¹². Anti-TPO-Antikörper sind in den meisten Fällen von Hashimoto-Thyroiditis und Basedow-Krankheit, bei Myxödem vorhanden, häufig in Verbindung mit Anti-Thyroglobulin-Autoantikörpern. Der Zusammenhang mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen bei der Schwangerschaft stieß bisher auf großes Interesse und es wurden in den meisten Fällen von postpartalem Schilddrüsensyndrom TPO-Antikörper nachgewiesen¹³⁻¹⁶ sowie ein Zusammenhang von Schilddrüsen-Autoantikörpern mit einem erhöhten Risiko für Fehlgeburten¹⁷. Anti-TPO Antikörper treten in anderen nicht mit der Schilddrüse zusammenhängenden Befunden auf, z. B. perniziöse Anämie^{18,19}, Zuckerharnruhr^{20,21}, Rheumatoidarthritis²², Hunter-Addison'sche Krankheit²¹ und Sjögren-Syndrom¹⁹. Darüber hinaus sind Anti-TPO-Antikörper mit niedrigem Titer bei 2-8% der scheinbar gesunden Personen nachweisbar, insbesondere bei älteren Personen und häufiger bei Frauen als bei Männern, wobei die klinische Bedeutung dieser Befunde noch unklar ist.

TESTPRINZIP

Die Vertiefungen der Mikrotiterstreifen sind mit humanem rekombinanten TPO (rTPO) 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 Enzymmarkierter 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-TPO-Autoantikörper-Konzentration durch Interpolation einer auf die Standards bezogenen Dosis-Wirkungskurve bestimmt werden. Die Standards werden mit dem Referenzpräparat für thyreoidale mikrosomale Antikörper NIBSC 66/387 geeicht.

TESTKIT-REAGENZIE

A	IgG-Konjugat 1	1 x 15 mL	Mit alkalischer Phosphatase markierter Antikörper gegen Human-IgG Tris-Puffer, Proteinstabilisator, <0,1% (w/v) Natriumazid.	
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	TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen	12 x 8 Streifen mit Mikrotitervertiefungen	Beschichtet mit humanem rekombinanten TPOAntigen, in einer wiederverschließbaren Folienpackung mit Trockenmittel. Farbkodierung: ROT. Von jedem Mikrotiterstreifen können einzelne Vertiefungen abgebrochen werden	
F	Probendiluenskonzentrat (5X)	1 x 25 mL	Phosphatpuffer, Proteinstabilisator, 0,5% (w/v) Natriumazid. Vor Gebrauch verdünnen.	
1-5	Anti-TPO- Standards	5 x 1.0 mL	Humanplasma, Puffer, <0,1% (w/v) Natriumazid. 0, 8, 25, 125, 500 IE/mL. Gebrauchsfertig.	
6	Anti-TPO-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 REAGENZIE

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

Dieser Test wird für Serum- oder EDTA-Plasmaproben, Lithiumheparin-, Natriumzitrat-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", 3. 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.

V O R B E R E I T U N G

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 1 mL. 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	10 µl	1 mL verdünntes Probendiluens

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

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

T E S T P R O T O K O L L

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.

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:

Extinktionsverhältnis

<1.0

≥1.0

Interpretation der Ergebnisse

Negative

Positive

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.

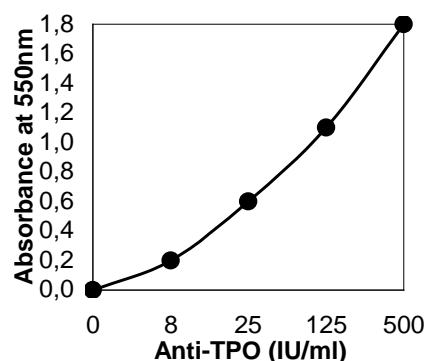
Proben mit Absorbanzen über Standard 5 (500 IE/mL) liegen außerhalb des Assaybereichs und werden als >500 IE/mL angegeben, verdünnt und nochmals getestet und um diesen weiteren Verdünnungsfaktor berichtet.

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 IE/mL
1	0
2	8
3	25
4	125
5	500

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)	Extinktion für die Positive Kontrolle Siehe Etikett für die Positiv-Kontrolle

	Extinktion der Referenzkontrolle
	Extinktion für die Negativ Kontrolle
Quantitativ	_____ <1.0
	Extinktion der Referenzkontrolle
	Siehe Etikett für den zulässigen erwarteten Bereich (IE/mL) für die Positiv-Kontrolle.
	Konzentration der Negativ-Kontrolle <10 IE/mL

ERWARTETE WERTE

172 Serumproben von asymptomatischen, scheinbar gesunden Spendern im Alter von 21 bis 51 Jahren, bestehend aus etwa gleich vielen Männern und Frauen, wurde mit Hilfe des DIASTAT Tests und einem weiteren, auf dem Markt angebotenen Gerät auf vorhandene Anti-TPO Autoantikörper untersucht. 16 (7%) Proben waren in dem weiteren Prüfgerät positiv und wurden bei der Berechnung des DIASTAT-Referenzbereichs nicht berücksichtigt. Von den verbliebenen 156 Ergebnissen wiesen 153 (98%) Werte unter 10 IE/mL auf. Auf Grundlage dieser Daten beträgt die Grenzwertempfehlung für das DIASTAT Anti-TPO ELISA 10 IE/mL. Dieser Referenzbereich wird lediglich als Empfehlung vorgeschlagen, jedes Labor sollte einen für die jeweilige Patientenpopulation und klinische Praxis angemessenen Referenzbereich festlegen. Konzentrationen sind in beliebigen Einheiten ausgedrückt, welche von Standards abgeleitet sind, die mit dem Referenzpräparat für thyreoidale mikrosomale Antikörper NIBSC 66/387 geeicht wurden.

Referenzbereich

<10 IE/mL = Negativ

≥10 IE/mL = Positiv

LEISTUNGSMERKMALE

Konkordanzstudie

Die Leistung des DIASTAT Anti-TPO-Tests wurde mit einem auf dem Markt angebotenen Test zur Messung von Autoantikörpern zu TPO verglichen. Es wurden insgesamt 377 Proben ausgewertet, die ein Spektrum von Krankheiten der Schilddrüse und Proben aus einer asymptomatischen Population umfassten. Die folgenden Ergebnisse wurden gewonnen:

		Immunanalyse Anti-TPO	
		+ve	-ve
DIASTAT ANTI-TPO	+ve	169	9
	-ve	9	190

Kopositivität = 94,9%

Konegativität = 95,5%

Gesamtübereinstimmung = 95,2% (n=377)

Klinische Sensitivität

Die klinische Sensitivität wurde durch Untersuchung von 51 Proben von Patienten mit Hashimoto-Syndrom und 52 von Patienten mit Basedow-Krankheit beurteilt. Die Diagnose basierte auf den Diagnosekriterien des Labors.

49/51 (96,1%) der Patienten mit Hashimoto-Syndrom zeigten ein positives Ergebnis.

38/52 (73%) der Patienten mit Basedow-Krankheit zeigten ein positives Ergebnis.

Nachstehend finden Sie die Verteilung der Anti-TPO Ergebnisse in den normalen, Basedow- und Hashimoto-Populationen.

Diagnosis	n	0-9.9 IE/mL	10-14.9 IE/mL	15-99.9 IE/mL	100-249.9 IE/mL	250-500 IE/mL
Normale	153	153 (100%)	0	0	0	0
Basedow	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimoto	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

Verdünnungsmerkmale

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

Probe	Verdünnung	Mittelwert IE/mL	Für die Verdünnung bereinigte Wiederfindung (%)
1	A	344.6	100
	A/2	163.2	95
	A/4	80.5	93
	A/8	41.7	97
2	A	449.8	100
	A/2	221.7	99
	A/4	102.7	91
	A/8	51.3	91

Impräzision

1. **Die Intraassay-Impräzision** wurde durch Testen von drei Kontrollen in 20 Assays durch einen Laboranten und mit zwei Testchargen, bestimmt.

Kontrolle	Mittelwert IE/mL	Quadratisches Mittel %VK
1	12.8	5.9%
2	88.0	4.5%
3	243.3	4.4%

2. **Die Interassay-Impräzision** wurde durch Testen von drei Kontrollen in 20 Assays durch einen Laboranten und mit zwei Testchargen, bestimmt.

Kontrolle	Mittelwert IE/mL	SD	VK (%)
1	12.8	1.0	7.6%
2	88.0	7.9	9.0%
3	243.3	25.5	10.5%

Untere Nachweisgrenze

Die untere Nachweisgrenze, berechnet als Mittelwert des Nullstandards plus zwei Standardabweichungen erfolgte in Doppelbestimmungen von 20 in zwei Testpartien und wurde mit 1,0 IE/mL berechnet

Störfaktoren

Hämolyse bis 4,0 mg/mL, Bilirubin bis 0,2 mg/mL, Intralipid (bzw. Lipide) bis 15 mg/mL und Vorhandensein eines Rheumafaktors bis 200 IE/mL führten zu Ergebnissen innerhalb von +/- 10 % des Zielwerts.

ANWENDUNGSGRENZEN









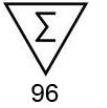


1. Obwohl das Vorliegen hoher Antikörperspiegel gegen die Schilddrüsenperoxidase ein Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung ist, müssen bei der Auswertung der Daten auch andere klinische Befunde und Laborbefunde berücksichtigt werden.
2. Bei einigen Patienten können hohe Anti-TPO-Antikörper-Spiegel mit 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.
3. Niedrige Anti-TPO-Spiegel können auch bei scheinbar gesunden Personen vorliegen. Die klinische Bedeutung dieser Information ist zur Zeit noch unklar.
4. Für eine wiederholte Probengewinnung vom Patienten, wie zum Beispiel zur Überwachung, ist die gesamte Studienperiode über immer der gleiche Probentyp (Serum oder EDTA-, Heparin- oder zitriertes Plasma) zu verwenden.

REFERENCES

1. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. *Proc R Soc Med*, **50**, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. *Federation of European Biochemical Societies*, **190** No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. *J Endocrin Invest*, **9**, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. *J Clin Invest*, **79**, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Suppl. **281**, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. *J Clin Invest*, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. *Clin Exp Immun*, **45**, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. *Endocrine Revs*, **5**, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. *Immunology*, **64**, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **67**, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **58**, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. *Thyroid Today*, **16**, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. *Thyroid*, **9** No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. *Jama*, **264** No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. *European Journal of Endocrinol*, **141**, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. *Autoimmunity*, **9**, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. *European Journal of Endocrinol*, **139**, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl*, **281**, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986





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 Negativ-Kontrollen 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. 30 ± 5 Minuten bei 18-25° C inkubieren.
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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

COMPONENTI DEL KIT

A	Coniugato IgG 1	1 x 15 mL	Anticorpi, marcati con fosfatasi alcalina per le IgG umane, 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 di TPO e supporto per strip	8 pozzetti di microtitolazione da 12 strip	Rivestiti con antigene umano TPO ricombinante, in confezione di alluminio risigillabile con essiccante. Codice a colori: ROSSO . I singoli pozzetti possono essere staccati da ciascuna strip di microtitolazione.	
F	Diluyente 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	Anti-TPO Standards	5 x 1.0 mL	Plasma umano, tampone, azide di sodio <0,1% (p/v). 0, 8, 25, 125, 500 IU/mL. Pronto per l'uso.	
6	Controllo di riferimento anti-TPO	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 diluyente 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 diluyente 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 diluyente 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, litio eparina o plasma sodio 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° C per due settimane.

AVVERTENZE E PRECAUZIONI I

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 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 550 nm (540-565 nm è accettabile).
2. Pipette di precisione per dispensare 10µL, 100µL, 1mL. Pipetta automatica per dispensare 100µL. Pipetta automatica per dispensare 200µL per il lavaggio manuale. Lavapietra automatica opzionale.
3. Dosatori cilindrici in vetro o plastica: 1x100 mL, 1x400 mL.
4. Contenitore di 1 mL 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	10 μ L	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 100 μ L 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 \pm 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 200 μ L di tampone di lavaggio diluito. Decantare il liquido ed asciugare i pozzetti con materiale assorbente dopo ogni lavaggio.
6. Aggiungere 100 μ L di coniugato IgG 1 in ciascun pozzetto.
7. Incubare 30 \pm 5 minuti a 18-25° C.
8. Ripetere le operazioni riportate ai punti 4 e 5.
9. Aggiungere 100 μ L di substrato in ciascun pozzetto.
10. Incubare 30 \pm 5 minuti a 18-25° C. Non decantare.
11. Aggiungere 100 μ L 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.

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

Protocollo qualitativo

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

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:

Rapporto di assorbanza

<1.0

≥1.0

Interpretazione dei risultati

Negativo

Positivo

Protocollo quantitativo

Mettere in grafico il valore medio d'assorbanza per ciascuno standard contro la concentrazione standard log₁₀ (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 spline.

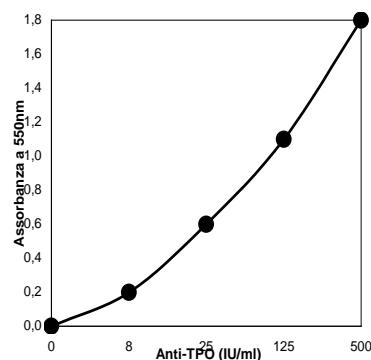
I campioni con assorbanza superiore allo standard 5 (500 IU/mL) sono fuori intervallo di dosaggio e vanno riportati come >500 IU/mL, diluiti e rianalizzati, correggendo il fattore di diluizione.

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	8
3	25
4	125
5	500

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
	$\frac{\text{Assorbanza controllo negativo}}{\text{Assorbanza controllo di riferimento}}$	<1.0
Quantitativo	Vedere l'etichetta del controllo positivo per l'intervallo accettabile previsto (IU/mL).	
	Concentrazione controllo negativo <10 IU/mL	

VALORI ATTESI

172 campioni sierici, prelevati da donatori asintomatici, apparentemente sani, comprendenti un rapporto pressoché eguale di soggetti maschili e femminili di età compresa tra 21 e 51 anni, sono stati analizzati per la presenza di autoanticorpi anti-TPO utilizzando il test DIASTAT ed un ulteriore test disponibile sul mercato. 16 campioni (7%) sono risultati positivi nell'altro test e sono stati pertanto omessi dal calcolo dell'intervallo di riferimento DIASTAT. In 153 (98%) dei restanti 156 campioni, i valori erano inferiori a 10 IU/mL. Alla luce di questi dati, il valore di normalità suggerito per l'ELISA anti-TPO DIASTAT è 10 IU/mL. Questo intervallo di riferimento viene suggerito a solo scopo indicativo; ogni laboratorio deve pertanto stabilirne uno proprio, che sia specifico alla popolazione di pazienti coperta e alla pratica clinica adottata. Le concentrazioni sono espresse in unità derivate dagli standard tarati contro il preparato di riferimento di anticorpi microsomiali tiroideo NIBSC 66/387.

Intervallo di riferimento
 <10 IU/mL = Negative
 ≥10 IU/mL = Positive

DATI SULLE PRESTAZIONI

Studio di concordanza

Si è confrontato il livello prestazionale del test anti-TPO DIASTAT con un test disponibile sul mercato per la misurazione degli autoanticorpi verso la TPO. Sono stati valutati 377 campioni in totale, che coprivano uno spettro di patologie associate alla tiroide e quelli prelevati da pazienti asintomatici. Sono stati ottenuti i seguenti risultati:

Immunodosaggio anti-TPO			
	+ve	-ve	
DIASTAT anti-TPO	+ve	169	9
	-ve	9	190

Copositività = 94,9%

Conegatività = 95,5%

Concordanza totale = 95,2% (n=377)

Sensibilità clinica

Si è valutata la sensibilità clinica analizzando 51 campioni prelevati da pazienti con diagnosi di morbo di Hashimoto e 52 di pazienti affetti da morbo di Graves. La diagnosi era basata sui criteri diagnostici dei laboratori.

49 dei 51 campioni (96,1%) dei pazienti affetti da morbo di Hashimoto erano positivi.

38 dei 52 campioni (73%) dei pazienti affetti da morbo di Graves erano positivi.

Nella tabella che segue è riportata la distribuzione dei risultati anti-TPO nelle popolazione sana, Graves e Hashimoto.

Diagnosi	n	0-9.9 IU/mL	10-14.9 IU/mL	15-99.9 IU/mL	100-249.9 IU/mL	250-500 IU/mL
Sana	153	153 (100%)	0	0	0	0
Graves	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimoto	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

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	344.6	100
	A/2	163.2	95
	A/4	80.5	93
	A/8	41.7	97
2	A	449.8	100
	A/2	221.7	99
	A/4	102.7	91
	A/8	51.3	91

Imprecisione

1. **Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando tre controlli in 20 dosaggi, utilizzando uno operator e due lotti di kit

Controllo	Valore medio IU/mL	Radice quadrata media%CV
1	12.8	5.9%
2	88.0	4.5%
3	243.3	4.4%

2. **Imprecisione intradosaggio** determinata analizzando tre controlli in 20 dosaggi, utilizzando uno operator e due lotti di kit.

Controllo	Valore medio IU/mL	DS	%CV
1	12.8	1.0	7.6%
2	88.0	7.9	9.0%
3	243.3	25.5	10.5%

Limite inferiore di rivelazione

Il limite inferiore di rivelazione, calcolato quale valore medio dello standard zero più due deviazioni standard eseguito in repliche di 20 in due lotti di kit, era 1,0 IU/mL.

Interferenze

L'emolisato fino a 4,0 mg/dl, la bilirubina fino a 0,2 mg/mL, gli intralipidi (o lipidi) fino a 15 mg/mL e la presenza del fattore reumatoide fino a 200 IU/mL hanno generato risultati compresi entro +/- 10% del valore bersaglio.

LIMITI D'IMPIEGO









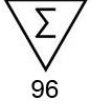


- Sebbene la presenza di titoli elevati di anticorpi verso la perossidasi tiroidea sia indice di malattia autoimmune della tiroide, i dati vanno valutati alla luce di altri referti clinici e di laboratorio.
- In alcuni soggetti possono essere presenti elevati livelli di anticorpi anti-TPO con scarsa 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.
- Bassi titoli di anti-TPO possono essere rivelati in soggetti apparentemente sani; la significatività clinica di questi dati non è stata tuttora chiarita.
- Nel caso di analisi ripetute sui campioni dei pazienti, ad es. per monitoraggio, utilizzare lo stesso tipo di campione (siero o plasma EDTA, litio-eparinato o citrato) per l'intera durata del periodo di studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. *Proc R Soc Med*, **50**, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. *Lancet II*, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. *Federation of European Biochemical Societies*, **190** No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. *J Endocrin Invest*, **9**, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. *J Clin Invest*, **79**, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. *Acta Endocrinol*, (Copenh) Suppl. **281**, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. *J Clin Invest*, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. *Exp Clin Endocrinol*, **97** No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. *Clin Exp Immun*, **45**, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. *Endocrine Revs*, **5**, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. *Immunology*, **64**, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **67**, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. *J Clin Endocrin Metab*, **58**, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. *Thyroid Today*, **16**, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. *Thyroid*, **9** No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. *Jama*, **264** No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. *European Journal of Endocrinol*, **141**, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. *Autoimmunity*, **9**, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. *European Journal of Endocrinol*, **139**, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. *Acta Endocrinol (Copenh) Suppl*, **281**, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. *Ann Rheum Dis*, **45**, 323-326, 1986

RIEPILOGO DEL PROTOCOLLO

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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / Controles Positivos / Positiv-Kontrollen / Controlli Positivi / Positiva kontrollen
CONTROL -	Negative Controls/ Témoins négatifs / Controles Negativos / Negativ-Kontrollen / Controlli negativi / Negativa kontrollen

SVENSKA: AVSEDD ANVÄNDNING

DIASAT[®] Anti-Thyroid Peroxidase (anti-TPO) test är en kvantitativ/kvalitativ enzymkopplad immunosorbentanalys (ELISA) för detektering av IgG-autoantikroppar specifika för tyreoida-peroxidase i humanserum eller EDTA-, litiumheparin- eller natriumcitratplasma. Testet är avsett som hjälp vid diagnos av tyreoida autoimmuna störningar. Testet kan inte användas som ensamt diagnostiskt hjälpmedel. Mängden autoantikroppar är bara en parameter i en diagnostisk process baserad på ett antal kriterier.

INLEDNING





Tyreoida autoimmuna störningar omfattar autoimmun destruktion och stimulering; båda tillstånden associeras med lokala och cirkulerande tyreoida autoantikroppar som främst består av IgG.

Förekomst av antikroppar mot tyreoglobulin (Tg) hos patienter med Hashimotos struma demonstrerades först 1956 av Roitt, et al 1, via geldiffusionsfällning. Trotter, et al 2 och Roitt, et al 3 har därefter visat att många patienter med avancerad tyreoidit har antikroppar mot ett tyreoidaantigen som skiljer sig från Tg. Det har benämningen mikrosomalt tyreoidaantigen (TMA). Betydande bevis indikerar att TMA är relaterat till tyreoida-peroxidase (TPO), ett membranbundet glykoproteinzym med ungefärlig massa på 101 kD, vars in vivo-funktion är jodinerings av tyrosin i syntes av tyreoidahormonerna T3 och T4. TMA och TPO kan vara identiska delar⁴⁻⁸. Kloning av human-TPO ger ytterligare stöd för deras nära identitet⁹. AntiTPO-autoantikroppar kan spela en patologisk roll i destruktiva tyreoida autoimmuna sjukdomar eftersom de kan fixera komplement och följaktligen inducera cytolys^{10,11}. Autoimmun reaktivitet på TPO anses vara polyklonal, med autoantikroppar som reagerar på minst sex skilda determinanter¹². Anti-TPO-antikroppar detekteras, ofta i förbindelse med autoantikroppar mot tyreoglobulin, i största delen av Hashimotos struma, Graves sjukdom och i fall av primärt myxödem. Sambandet mellan tyreoid autoimmun sjukdom och graviditet har varit ett område av betydande intresse, efter påvisande av anti-TPO-antikroppar i de flesta fall av postpartum tyreoidit¹³⁻¹⁶ och samband mellan tyreoida autoantikroppar och ökad risk för missfall¹⁷. Anti-TPO-antikroppar detekteras i andra icketyreoida tillstånd, t.ex. pernicios anemi^{18,19}, diabetes mellitus^{20,21}, reumatoid artrit²², Addisons sjukdom²¹ och Sjögrens syndrom¹⁹. Dessutom kan låga nivåer av anti-TPO-antikroppar detekteras hos 2-8 % av uppenbart friska individer, särskilt hos äldre och oftare hos kvinnor än män, även om den kliniska betydelsen av detta är oklar.

ANALYSPRINCIP

Brunnarna på mikrotiterstrippen är belagda med rekombinant human-TPO (rTPO). Under den första inkubationen binder sig specifika autoantikroppar i utspätt serum eller plasma till den antigenbelagda ytan. Brunnarna tvättas sedan för att avlägsna obundna komponenter. I den andra inkubationen binder sig konjugatet av enzymmärkta antikroppar mot human-IgG till ytbundna autoantikroppar. Efter vidare tvätt spåras specifika autoantikroppar genom inkubation med substratet. Vid tillsättning av stopplösning avbryts reaktionen, vilken resulterar i en färgad slutprodukt. Mängden bundet konjugat mäts i absorbansenheter. I det kvalitativa protokollet jämförs mängden konjugat som bundits för provet med det som bundits för referenskontrollen. I det kvantitativa protokollet kan koncentrationen anti-TPO-autoantikroppar uppskattas genom interpolation från en dosresponskurva som baseras på standarden. Standarderna kalibreras mot NIBSC 66/387 referenspreparat med mikrosomala tyreoida antikroppar.

KITKOMPONENTER

A	IgG-konjugat	1 x 15 mL	Alkalisk fosfatas-märkta antikroppar mot human-IgG i Tris-buffertlösning med bovin serum albumin (BSA) och <0,1 % (vikt/volym) natriumazid. Färdig att användas.	
B	Substrat	1 x 15 mL	Magnesium 2+-jon som enzym-cofaktor, fenoltaleinmonofosfat (PMP) och ~ 10 % Bronidox i buffertlösning. Får inte utsättas för ljus under förvaring. Substratet bör vara blekgult. All rosa färgning indikerar kontamination och reagensen måste kasseras.	
C	Stopplösning	1 x 15 mL	Buffertlösning med ~ 5 % 0,4N natriumhydroxid, EDTA tetranatriumsalt och natriumkarbonat, pH >10. Färdig att användas.	
D	Tvättbuffertkoncentrat (16X)	3 x 25 mL	Boratbuffertlösning, Triton X-100 och 0,4 % (vikt/volym) natriumazid.	
E	TPO-belagda brunnar och striphållare	Mikrotiterstrips med 12 x 8 brunnar	Belagda med rekombinant TPO-antigen, i en återförseglingsbar folieförpackning med torkmedel. Färgkodad RÖD. Enstaka brunnar kan brytas av från varje mikrotiterstrip.	
F	Provspädningskoncentrat (5X)	1 x 25 mL	Fosfatbuffertlösning, bovin serum albumin (BSA) och 0,5 % (vikt/volym) natriumazid. Späds före användning.	
1-5	Anti-TPO standarder	5 x 1,0 mL	Humanplasma i buffert med < 0,1 % (vikt/volym) natriumazid, innehållande 0, 8, 25, 125, och 500 IE/mL. FÄRDIG FÖR ANVÄNDNING, BEHÖVER INTE SPÄDAS UT.	
6	Anti-TPO-referenskontroll	1 x 1,5 mL	Humanplasma i buffert med < 0,1 % (vikt/volym) natriumazid. FÄRDIG FÖR ANVÄNDNING; BEHÖVER INTE SPÄDAS UT.	
+/-	Positiv kontroll Negativ kontroll	1 x 0,2 mL 1 x 0,1 mL	Humanserum med < 0,1 % (vikt/volym) natriumazid. Späd 1:101 med utspädd provdiluent före användning, som för prover.	
	Bruksanvisning			

FÖRVARING

Hållbarhet efter öppnandet

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

Hantering och förfarande

1. Lagra komponenterna vid 2-8° C. Använd inte någon komponent efter det utgångsdatum som anges på etiketten.
2. Blanda inte komponenter med olika satsnummer.
3. Frys inte komponenterna.
4. Glöm inte att späda koncentrerad tvättbuffert, spädvätska och positiva och negativa kontroller före användning. De övriga komponenterna är klara att använda.
5. 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.
6. Lägg tillbaka oanvända mikrotiterstrips i folieförpackningen och förvara vid 2-8° C tillsammans med torkmedlet, tills produkten skall användas på nytt.
7. Striphållaren är utformad för strips med lossbrytbara brunnar.
8. Utsätt ej substratet för ljus under förvaring.
9. Undvik att kontaminera reagensen. Använd en ny engångspipett för varje pipettering av reagens i 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 eller EDTA-, litiumheparin- natriumcitratplasma; använd inte kraftigt hemolytiska eller turbida prover. Blanda upptinade prov omsorgsfullt före analysen, och undvik upprepad frysning/tining. Värmeinaktivera inte proven, eftersom detta kan orsaka falskt positiva svar. Prover bör förvaras i ej utspädd form eller som 1:101-spädning i provspädningsvätska vid -20°C eller $2-8^{\circ}\text{C}$ i två veckor.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSMÅTT

Avsett endast för *in vitro* diagnostik.

Försiktighetsmått

1. Följ anvisningarna i den här texten noggrant, särskilt i fråga om hantering och lagring.
2. Standarder och kontroller innehåller human plasma som testats med FDA-godkända metoder för analys av hepatit B-antigen, 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 standarder och kontroller 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, konjugatlösningen, spädvätskan och tvättbufferten ingår natriumazid, som kan reagerar med bly och koppar och därvid ge upphov till explosiva metallazider. När vätskorna kvittblives 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 andningsorgan. Om kontakt med hud, ögon eller andningsorgan. skölj med vatten och sök medicinsk hjälp.
9. På begäran kan Euro Diagnostica tillhandahålla säkerhetsdatablad om alla farliga komponenter som ingår i kitet.



Varning

B.

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 mikrotiterplattorna, 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 tillhandahålls i strips om åtta brunnar. Om något antal än en multipel med åtta skall användas gör man så här:

1. Lossa stripen 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/standarder 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 avloppsvask 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 IgG-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.

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

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 Diagnostics kliniska studier indikerar följande gränser:

Absorbanskvot	Bedömning av resultatet
<1.0	Negativ
>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 parametrar, logistisk (4PL), 5 parameter (5PL) log/logit eller spline kan också ge godtagbart resultat.

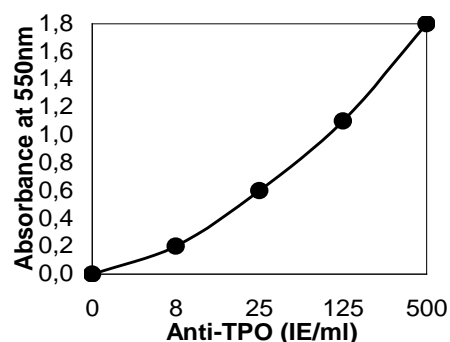
Prov vilkas absorbans ligger högre än absorbansen hos standardprov 5 (500 IE/mL) ligger utanför analysområdet och bör rapporteras som >500 IE/mL. En ny analys bör göras med anpassning av utspädningen.

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	8
3	25
4	125
5	500

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 kontrollprov vid alla analyser, för att därigenom kunna kontrollera testproceduren. Sätt den användningsklara referenskontrollen i två brunnar 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 kontrollprov 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 kontrollernas absorptionskvot

Analystyp	Specifikationer
Kvalitativ (kvoter)	Absorbans positiv kontroll / Absorbans referenskontroll — se etikett för positiv kontroll
	Absorbans negativ kontroll / Absorbans referenskontroll — <1.0
Kvantitativ	På etiketten till den positiva kontrollen anges godtagbart förväntat intervall (IE/mL)
	De negativa kontrollens värde skall vara lägre än 10 IE/mL

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

172 serumprover från asymptomatiska, till synes friska individer som omfattade ungefärligen ett likvärdigt antal män och kvinnor mellan 21 och 51 års ålder, testades för förekomst av anti-TPO-autoantikroppar med DIASTAT-test och vidare med en kommersiellt tillgänglig analys. Sexton prover (7 %) var positiva i den andra analysen, och uteslöts vid beräkningen av referensmätområde för DIASTAT. Av de återstående 156 resultaten visade 153 (98 %) värden under 10 IE/mL. Med dessa uppgifter som grund är det föreslagna gränsvärdet för DIASTAT[®] anti-TPO ELISA under 10 IE/mL.

Referensområdet föreslås endast som en riktlinje, och varje laboratorium bör etablera ett referensområde som är tillämpligt för dess patientpopulationer samt klinisk praxis. Koncentrationerna uttrycks i enheter som härstammar från standarder som kalibrerats mot NIBSC 66/387 referenspreparat med mikrosomala tyreoida antikroppar.

<p><i>Referensintervall</i> <10 IE/mL = Negativ ≥10 IE/mL = Positiv</p>
--

P R E S T A N D A

Korrelationsstudie

Prestandan för DIASTAT[®] Anti-TPO test jämfördes med ett kommersiellt tillgängligt test för mätning av autoantikroppar mot TPO. Totalt 377 prover utvärderades, vilket omfattar ett spektrum tyreoidassocierade sjukdomar samt prover från en asymtomatisk population. Följande resultat erhöles:

		Immunoassay anti-TPO	
		+ve	-ve
DIASTAT ANTI-TPO	+ve	169	9
	-ve	9	190

DIASTAT ANTI-TPO

Ömsesidig positivitet = 94,9 %

Ömsesidig negativitet = 95,5 %

Total korrelation = 95,2 %

Klinisk sensitivitet

Den kliniska sensitiviteten utvärderades med test av 51 prover från patienter som fått diagnosen Hashimotos struma och 52 från patienter som har Graves sjukdom. Diagnosen baserades på laboratoriernas diagnostiska kriterier.

49/51 (96,1 %) av patienter med Hashimotos struma visade positiva resultat vid DIASTAT[®] Anti-TPO.

38/52 (73 %) av patienter med Graves sjukdom visade positiva resultat vid DIASTAT[®] Anti-TPO.

Fördelningen av anti-TPO-resultat hos normala populationer, samt populationer med Graves och Hashimoto, anges nedan.

Diagnoser	n	0-9.9 IE/mL	10-14.9 IE/mL	15-99.9 IE/mL	100-249.9 IE/mL	250-500 IE/mL
Normaler	153	153 (100%)	0	0	0	0
Graves	52	14 (27%)	6 (12%)	5 (10%)	8 (15%)	19 (37%)
Hashimoto	51	2 (4%)	1 (2%)	8 (16%)	14 (27%)	26 (51%)

Spädningsegenskaper

Fyra spädningar av två patientprover analyserades med två kitsatser. Efterföljande tabell visar erhållna medelvärden och återvinning justerad för spädning.

Prov	Spädning	Medelvärde IE/mL	%-Återvinning, justerad för spädning
1	A	344,6	100
	A/2	163,2	95
	A/4	80,5	93
	A/8	41,7	97
2	A	449,8	100
	A/2	221,7	99
	A/4	102,7	91
	A/8	51,3	91

Precision

1. **Precisionen inomserie** fastställdes genom test av tre kontroller i 20 analyser, med en operatör och två kitsatser.

Kontroll	Medelvärde IE/mL	RMS %CV
1	12,8	5,9
2	88,0	4,5
3	243,3	4,4

2. **Precisionsen mellanserie** fastställdes genom test av tre kontroller i 20 analyser, med en operatör och två kitsatser.

Kontroll	Medelvärde IE/mL	SD	%CV
1	12,8	1,0	7,6
2	88,0	7,9	9,0
3	243,3	25,5	10,5

Lägre detekteringsgräns

Den lägre detekteringsgränsen, beräknad från medelvärdet för nollstandard plus två standardavvikelser, vid analys med 20 replikat i två kitsatser beräknades som 1,0 IE/mL.

Störningar

Hemolysat upp till 4,0 mg/dl, bilirubin upp till 0,2 mg/mL och intralipid upp till 15 mg/mL samt närvaro av reumatoid faktor upp till 200 IE/mL frambringade resultat inom $\pm 10\%$ av målvärdet.

B E G R Ä N S N I N G A R












- Även om förekomsten av antikroppar mot tyreperoxidas indikerar tyreoid autoimmun sjukdom måste uppgifterna bedömas tillsammans med andra kliniska fynd och laboratorieresultat.
- Vissa individer kan ha höga nivåer av anti-TPO-antikroppar, med lite eller inga symptom på klinisk sjukdom. Å andra sidan kan vissa patienter med tyreoid autoimmun sjukdom ha odetekterbara nivåer av dessa antikroppar.
- Anti-TPO kan detekteras hos uppenbart friska individer. Denna informations kliniska betydelse är för närvarande oklar.
- För upprepade patientprover, t.ex. för övervakning, bör samma typ av prov (serum eller EDTA-, heparin- eller citratplasma) användas under hela studieperioden.

REFERENSER

1. Roitt IM, et al. Lancet II, 820-821, 1956.
2. Trotter WR, et al. Proc R Soc Med, 50, 961, 1957.
3. Roitt IM, et al. Lancet II, 1027-1033, 1958.
4. Czarnocka B, et al. Federation of European Biochemical Societies, 190 No. 1, 147-152, 1985.
5. Czarnocka B, et al. J Endocrin Invest, 9, 135-138, 1986.
6. Hamada N, et al. J Clin Invest, 79, 819-825, 1987.
7. Ruf J, et al. Acta Endocrinol, (Copenh) Suppl. 281, 49-56, 1987.
8. Portman L, et al. J Clin Invest, 81 April, 1217-1224, 1988.
9. Rapoport B. Exp Clin Endocrinol, 97 No. 2/3, 147-152, 1991.
10. Khoury EL, et al. Clin Exp Immun, 45, 316, 1981.
11. Weetman AP, et al. Endocrine Revs, 5, 309, 1984.
12. Doble ND, et al. Immunology, 64, 23-29, 1988.
13. Vargas VT, et al. J Clin Endocrin Metab, 67, 327-333, 1988.
14. Jansson R, et al. J Clin Endocrin Metab, 58, 681-687, 1984.
15. Stagnaro-Green A. Thyroid Today, 16, 1-11, 1993.
16. Lazurus JH. Thyroid, 9 No. 7, 685-689, 1999.
17. Stagnaro-Green A, et al. Jama, 264 No.11, 1422-1425, 1990.
18. Estienne V, et al. European Journal of Endocrinol, 141, 563-569, 1999.
19. Feldt-Rasmussen, et al. Autoimmunity, 9, 245-253, 1991.
20. Chang CC, et al. European Journal of Endocrinol, 139, 44-48, 1998.
21. Scherbaum WA. Acta Endocrinol (Copenh) Suppl, 281, 325-329, 1987.
22. Walker DJ, et al. Ann Rheum Dis, 45, 323-326, 1986.

PROTOKOLLSAMMANFATTNING

1. Späd prover och positiva samt negativa kontroller 1:101. Späd ej standarder eller referenskontroller.
2. Tillsätt 100 µL referenskontroll/kalibratorer i duplikat, förutspädda positiva och negativa kontroller samt prover i respektive brunnar på mikrotiterstripen.
3. Inkubera 60 ± 10 minuter vid $18-25^\circ \text{C}$.
4. Tvätta stripsen 5 gånger.
5. Tillsätt 100 µL IgG-konjugat i varje brunn.
6. Inkubera 30 ± 5 minuter vid $18-25^\circ \text{C}$.
7. Tvätta stripsen 5 gånger.
8. Tillsätt 100 µL substrat i varje brunn.
9. Inkubera 30 ± 5 minuter vid $18-25^\circ \text{C}$.
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	TPO-coated wells and strip holder / Cupules enduites de POT et Portebandes / Soporte para Bandas y Vasos Recubiertos con TPO / TPO-beschichtete Vertiefungen und Streifenrahmen / Pozzetti rivestiti di TPO e supporto per strip /TPO-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-TPO Standards 1-5/ Etalons anti-POT 1-5 / Estandares Anti-TPO 1-5 / Anti-TPO Standards 1-5 / Standard anti-TPO 1-5 / Anti-TPO-standarder
CONTROL REF	Anti-TPO Reference Control/ Témoins de référence anti-POT / Control de Referencia Anti-TPO / Anti-TPO Referenzkontrolle / Controllo di riferimento anti-TPO / Anti-TPO referenskontroll
CONTROL +	Positive Controls/ Témoins positifs / 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