

---

**AB-HTGK-3**  
(P000172)

---

DiaSorin

---

---

English.....	p. 1
Italiano.....	p. 8
Français.....	p. 15
Deutsch.....	p. 23
Español.....	p. 30
Português.....	p. 37
Czesky.....	p. 44
Ελληνικά.....	p. 51

**THYROGLOBULIN ANTIBODIES  
IMMUNORADIOMETRIC ASSAY KIT**

**Procedure for quantitative determination of  
autoantibodies to human thyroglobulin (IgG to hTg)  
in human serum or plasma samples**

For in vitro use only

**1. INTRODUCTION**

Autoimmune thyroid diseases encompass a wide spectrum of different clinical disorders varying from hypothyroidism (Hashimoto's disease) or hyperthyroidism (Graves-Basedow disease) to subclinical disease in asymptomatic euthyroid or biochemical hypothyroid subjects. The link between these extremes is the presence of serum autoantibodies directed to thyroid antigens.

Three distinct antigen-antibody systems – commonly found in normal thyroid tissue - have been described in human thyroiditis (autoimmune thyroid disease), involving respectively hTg, a colloid and a microsomal antigen (thyroid peroxidase).

Autoantibodies to hTg are immunoglobulins mainly belonging to the IgG class (IgG to hTg). The assessment of their presence is of great clinical usefulness in the diagnosis of autoimmune thyroid diseases including Graves-Basedow disease, Hashimoto's disease and idiopathic myxoedema.

The level of IgG to hTg is not related to the level of either T<sub>3</sub> or T<sub>4</sub>; in fact IgG to hTg may be present in the hypothyroid, euthyroid or hyperthyroid status.

Thyroid autoimmunity is more frequent in women, in whom antibody prevalence increases with age, rising from approximately 10% in the early twenties to 30% in the late sixties. Such autoantibody levels can lead to the development of chronic thyroiditis, resulting in hypothyroidism.

In case of idiopathic myxoedema, significant levels of autoantibodies are observed, indicating the end-stage of autoimmune atrophic chronic thyroiditis. In younger patients, a firm goitre found in combination with high levels of autoantibodies is generally an indication of Hashimoto's disease, characterized by progressive reduction of thyroid function, leading to hypothyroidism.

In the hyperthyroid Graves-Basedow disease, toxic goitre is associated with chronic thyroiditis, as confirmed by high serum levels of autoantibodies.

In all cases, monitoring of autoantibody levels is frequently used to follow up therapy and to identify family members at high risk of developing autoimmune disorders.

**2. PRINCIPLE OF THE ASSAY**

The assay is an immunoradiometric (IRMA) method. In the first assay stage, IgG to hTg contained in calibrators or samples binds to solid-phase hTg. In the second stage, the <sup>125</sup>I-tracer (<sup>125</sup>I-labelled protein A) is added, which binds to the solid-phase hTg-IgG complex. After a second incubation, the amount of <sup>125</sup>I-tracer bound to the solid phase is proportional to the concentration of IgG to hTg present in calibrators or samples to be assayed. At the end of each incubation, the unbound material is removed by aspiration and washing. The method adopted for B/F separation is based on the use of coated tubes, where hTg is coated on the tube walls.

The assay of IgG to hTg employs protein A as tracer, which is a bacterial cell wall protein derived from *Staphylococcus aureus*, capable of binding the Fc fragment of IgG molecules.

**3. REAGENTS PROVIDED IN THE KIT**

Coated tubes	100
<sup>125</sup> I-tracer	1 vial
Anti-thyroglobulin calibrators	6 vials
Control serum	1 vial
Sample diluent	2 bottles
Incubation buffer	1 bottle
Wash buffer	2 bottles
Number of tubes	100

*STORAGE: Upon receipt, the kit should be stored at 2-8°C. Do not freeze. Once opened, the reagents of this kit are stable until the kit expiry date when properly stored. The kit has been designed to perform 4 assay runs when used throughout the day at room temperature and stored overnight at 2-8°C.*

*Reagents should not be used past the expiry date. The expiry date of the kit is reported on the external label and corresponds to the expiry date of the tracer. The expiry date of each component is reported on the respective vial label.*

*When reconstituting the contents of the vials, mix gently to avoid foaming.*

*Reagents from different batches must not be mixed.*

### 3.1. Coated tubes

The inner surface of each tube is coated with highly purified biotinylated hTg.

*Before use, bring the coated tubes to room temperature prior to opening the box, to avoid condensation of humidity.*

*Securely reseal the box containing unused tubes. Do not mix different batches of coated tubes.*

### 3.2. <sup>125</sup>I-tracer (red): ready-to-use reagent

The vial contains 52 mL protein A labelled with <sup>125</sup>I, BSA, phosphate-citrate buffer, preservatives and an inert red dye. Radioactivity is 296 kBq (8 µCi) or less on the calibration date.

### 3.3. Anti-thyroglobulin calibrators: ready-to-use reagent

Each vial contains 0.5 mL of prediluted human serum containing IgG to hTg, calf serum, BSA, PBS buffer and preservatives. The calibrator concentrations are the following: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 IU/mL. The kit calibrators are referenced to MRC 65/93 International Standard. *The kit calibrators demonstrate commutability with patient samples when used with reagents and operating procedure of this in vitro diagnostic test as the manufacturer recommends. Because the calibrators have been prediluted 1:51 and values assigned accordingly, the IU/mL concentrations of the unknown specimens can be determined directly by interpolation from the calibration curve. A multiplying factor is necessary only when the specimen dilution is greater than 1:51.*

### 3.4. Control serum: lyophilized reagent

The vial contains prediluted human serum, anti-hTg antibodies, calf serum, BSA, PBS buffer and preservatives. The range of concentrations of each control is reported on the certificate of analysis and indicates the limits established by DiaSorin for control values that can be obtained in reliable assay runs.

Reconstitute the vial contents with 1 mL distilled water. The resulting solution is stable at 2-8°C until the kit expiry date. The control serum *should not be further diluted*. Read the value directly from the calibration curve.

### 3.5. Sample diluent: ready-to-use reagent

Each bottle contains 50 mL PBS buffer, calf serum, BSA and preservatives.

*The reagent is common to AB-TPOK-3 and AB-HTGK-3 kits.*

### 3.6. Incubation buffer (blue): ready-to-use reagent

The bottle contains 52 mL TRIS buffer solution, BSA, detergents, preservatives and an inert blue dye.

### 3.7. Wash buffer: reagent in solution (10x)

Each bottle contains 50 mL 0.5% Triton X-100 and saline solution.

Dilute the contents of each bottle to 500 mL with deionized water. The resulting solution is stable at 2-8°C until the kit expiry date. The reagent is used to rinse coated tubes.

## 4. EQUIPMENT AND MATERIALS REQUIRED, BUT NOT SUPPLIED

- Distilled or deionized water.
- Glassware.
- Disposable polystyrene tubes.
- Micropipettes with disposable tips (10, 50, 500, 1000 µL) (10, 50 µL: trueness ± 3%, precision 2%; 500, 1000 µL: trueness ± 2%, precision 1%).
- Test tube rack.
- Vortex mixer.
- Horizontal shaker capable of achieving a shaking speed of 300-350 rpm.
- Device for dispensing and aspiration of wash buffer capable of delivering 2-3 mL per wash cycle for two wash cycles.
- Gamma counter suitable for counting <sup>125</sup>I (counter window setting: 15-80 keV - counter efficiency: 70% - counting time: 1 min). If counter efficiency is below 60%, counting time should be prolonged to 2 min.

## 5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Either human serum or plasma may be used. The anticoagulants citrate, EDTA and heparin have been tested and may be used with this assay. Blood should be collected aseptically by venipuncture, allowed to clot, and the serum separated from the clot as soon as possible. Samples having particulate matter, turbidity, lipaemia, or erythrocyte debris may require clarification by filtration or centrifugation before testing. Grossly haemolyzed or lipaemic samples as well as samples containing particulate matter or exhibiting obvious microbial contamination should not be tested. If the assay is performed within 24 hours of sample collection, the samples should be kept at 2-8°C; otherwise they should be aliquoted and stored deep-frozen (-20°C or below). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

### Sample dilution

All samples should be diluted 1:51 with sample diluent (3.5) before assaying. Dispense 10 µL sample and 500 µL sample diluent into polystyrene tubes and mix with a Vortex. If high levels of IgG to hTg are expected, further dilution with the sample diluent supplied in the kit should be performed. *Calibrators and control serum are ready to use and must not be diluted.*

### 6. ASSAY PROCEDURE

Bring all reagents to room temperature (20-25°C) before assaying. Perform the assay at least in duplicate. Calibrators must be run with each series of patient specimens. Calibrators and samples should be subjected to the same process and incubation time. Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps. A clean, disposable tip should be used for dispensing each calibrator and sample.

- Dispense reagents *in the bottom of coated tubes*. Operate according to the following scheme:

reagents	tubes	Calibrators 0-5	Diluted samples
Calibrators		50 µL	–
Diluted samples		–	50 µL
Incubation buffer		500 µL	500 µL

- **Mix** the contents of tubes and **incubate for 2 hours at room temperature** while continuously shaking (300-350 rpm).
- Carefully **aspirate** the incubation mixture and **wash** twice with 2 mL wash buffer. *Be sure that the aspirator tip touches the bottom of the coated tube so that all the liquid is removed. Failure to remove adhering solution adequately may result in poor reproducibility and spurious results. No trace of dye should still be visible.*
- **Dispense 500 µL tracer** into all tubes. Prepare two non-coated tubes for total activity computation containing only 500 µL tracer and set them aside until counting.
- **Incubate for 2 hours at room temperature** while continuously shaking (300-350 rpm).
- Carefully **aspirate** tracer and **wash** twice with 2 mL wash buffer. Operate as above.
- **Measure the radioactivity** of tubes.

### 7. CALCULATION OF RESULTS

Compute the mean net counts for each group of tubes. Compute the B/T ratio for each calibrator and unknown sample as follows:

$$B/T\% = \frac{\text{calibrator or sample mean counts}}{\text{total activity mean counts}} \times 100$$

Plot in log-log coordinates the mean percent value for each calibrator on the ordinate (y axis) as a function of IgG to hTg concentration expressed as IU/mL on the abscissa (x axis). A calibration curve is thus obtained (Fig. 1). Directly from the calibration curve, read the IgG to hTg concentration of each sample expressed as IU/mL. If the sample was diluted beyond the initial 1:51 factor, the antibody concentration value derived from the diluted specimen must be multiplied by the additional dilution factor. Keep in mind that the calibrators are already diluted 1:51.

#### Calculation example

*The following data must only be considered an example and should not be employed instead of the data obtained by the user.*

Description	cpm	B/T x 100
Total activity	78,581	–
Zero calibrator/sample diluent	85	–
100 IU/mL	1,313	1.6
200 IU/mL	2,663	3.3
500 IU/mL	6,445	8.2
1500 IU/mL	19,955	25.3
6500 IU/mL	40,869	52.0
Sample	2,977	3.7

By interpolation from the calibration curve, the sample is found to contain 230 IU/mL IgG to hTg.

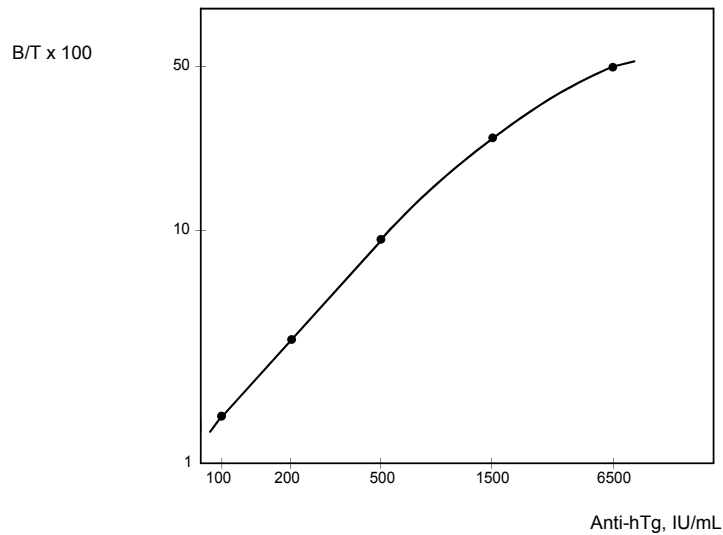


Fig. 1

### Interpretation of results

The first calibrator (100 IU/mL) represents the system's cut-off.

Samples with IgG to hTg values greater than or equal to the cut-off value should be graded positive. Samples with IgG to hTg values less than the cut-off value should be graded negative.

*However, samples whose IgG to hTg values range within  $\pm 20\%$  of the cut-off value should be graded disputable.*

*Each laboratory should establish its own reference ranges.*

### 8. EXPECTED VALUES

During the clinical investigation 211 subjects were taken into consideration. In this population the subjects were graded negative, positive and equivocal with a reference test. 96% of the subjects graded negative with DiaSorin kit showed values of IgG to hTg below 100 IU/mL and 100% of the subjects graded positive showed values of IgG to hTg above 100 IU/mL.

However, the values reported above are merely indicative: each laboratory should establish its own reference ranges.

### 9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

#### 9.1. Analytical specificity

Analytical specificity may be defined as the ability of the assay to accurately detect specific analyte in the presence of potentially interfering factors in the sample matrix (e.g., anticoagulants, haemolysis, effects of sample treatment), or cross-reactive analytes.

**Interference.** Controlled studies of potentially interfering substances or conditions showed that the assay performance was not affected by anticoagulants (citrate, EDTA, heparin), slight haemolysis (up to 20 mg/dL haemoglobin), lipaemia (up to 10000 mg/dL triglycerides), bilirubinaemia (up to 50 mg/dL bilirubin).

**Cross-reactions.** The use of highly purified hTg fixed on the solid phase curbs the possibility of interference from non-specific proteins.

No cross-reactivity is observed due to the presence of TPO autoantibodies up to a concentration of 1000 U/mL.

#### 9.2. Analytical sensitivity

Analytical sensitivity may also be expressed as the limit of detection, which is the minimal amount of specific analyte detectable by the assay. The limit of detection is 6 IU/mL at 95% confidence limit. This was calculated as the apparent concentration of analyte which was distinguishable from the zero calibrator (sample diluent), that is, two standard deviations above zero.

### 9.3. Precision

Different sample pools, containing different concentrations of specific analyte, were assayed to determine repeatability and reproducibility of the assay (i.e., within- and between-assay variability).

Repeatability	A	B	C
Number of determinations	10	10	10
Mean (IU/mL)	115	951	2924
Standard deviation	3.3	42.7	105.0
Coefficient of variation (%)	2.9	4.4	3.6

Reproducibility	A	D	E
Number of determinations	10	10	10
Mean (IU/mL)	119	793	2361
Standard deviation	13.9	53.0	177.0
Coefficient of variation (%)	11.6	6.7	7.5

### 9.4. Trueness

The assay trueness has been checked by the dilution test.

**Dilution test.** Two sera with high IgG to hTg concentration were tested after serially diluting with sample diluent.

Dilution	Expected concentration, IU/mL	Measured concentration, IU/mL	% Recovery
neat	–	3089.00	–
1:2	1544.50	1640.00	106.2
1:4	772.30	776.70	100.6
1:8	386.10	381.80	98.9
1:16	193.10	204.50	105.9
1:32	96.50	107.60	111.5
neat	–	2457.00	–
1:2	1228.50	1246.50	101.5
1:4	614.25	609.4	99.2
1:8	307.13	321.80	104.8
1:16	153.56	157.50	102.6

### 9.5. High-dose saturation effect

Whenever samples containing extremely high antibody concentrations are tested in a two-step sandwich method, the saturation effect can mimic concentrations lower than real. However, a well-optimized method excludes grossly underestimated results (as it may occur in one-step sandwich methods).

Concentrations of IgG to hTg up to 100,000 IU/mL were tested in this assay and it was observed that such levels produce analytical signals that are consistently above the top calibrator concentration (saturation curve). For correct quantification, samples containing IgG to hTg levels greater than that of the top calibrator should be diluted with sample diluent and retested. The results must then be multiplied by the additional dilution factor beyond the initial 1:51 to obtain the IgG to hTg levels of the neat specimens.

## 10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The use of radioimmunoassay has strongly reduced false positive results. However, diagnosis should not be established on the basis of a single test result, but should be determined in conjunction with clinical findings and other diagnostic procedures as well as in association with medical judgement.

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the specimens may affect the assay results.

A skillful technique and strict adherence to the instructions are necessary to obtain reliable results. In particular, precise pipetting and accurate aspiration and washing are essential.

Non-reproducible results may arise from methodological factors, such as:

- cross-exchange of vial caps
- use of the same tip when withdrawing from different vials or dispensing different samples
- leaving the vials open for long
- exposure of reagents or samples to intense heat or heavy sources of bacterial contamination
- inadequate aspiration of incubation mixture and rinsing of tubes
- contamination of tube rims by tracer or samples
- casual oscillations or inadequate handling of the gamma counter
- use of reagents from different master batches.

## 11. WARNINGS AND PRECAUTIONS

Test components contain sodium azide as a preservative. Because sodium azide may form explosive lead or copper azide in plumbing, it is recommended that drains be thoroughly flushed with water after disposal of solutions containing sodium azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Harmful if swallowed.

R 31 – Contact with acids liberates toxic gas.

S 28 – After contact with skin, wash immediately with plenty of water.

S 45 – In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

All serum and plasma units used to produce the components provided in this kit have been tested for the presence of HBsAg, anti-HCV, and anti-HIV-1/2 and found to be non-reactive. As, however, no test method can offer absolute assurance that pathogens are absent, all specimens of human origin should be considered potentially infectious and handled with care.

## 12. SAFETY PRECAUTIONS

- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics in the assay laboratory.
- Do not pipette solutions by mouth.
- Avoid direct contact with all potentially infectious materials by using protective clothing such as lab coats, protective glasses and disposable gloves. Wash hands thoroughly at the end of each assay.
- Avoid splashing or forming an aerosol. Any reagent spills should be washed with a 5% sodium hypochlorite solution and disposed of as though potentially infectious.
- All samples, biological reagents and materials used in the assay must be considered potentially able to transmit -infectious agents. They should therefore be disposed of in accordance with the prevailing regulations and guidelines of the agencies holding jurisdiction over the laboratory, and the regulations of each Country. Disposable materials must be incinerated; liquid waste must be decontaminated with sodium hypochlorite at a final concentration of 5% for at least half an hour. Any materials to be reused must be autoclaved using an *overkill* approach (USP 24, 2000, p. 2143). A minimum of one hour at 121°C is usually considered adequate, though the users must check the effectiveness of their decontamination cycle by initially validating it and routinely using biological indicators.

## 13. BASIC RULES OF RADIATION SAFETY

### Reagents Containing Iodine-125

This kit contains radioactive material which does not exceed 8.12  $\mu\text{Ci}$  (300 kBq) of iodine-125. Appropriate precautions and good laboratory practices should be used in the storage, handling, and disposal of this material.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a general license:

This radioactive material may be received, acquired, possessed, and used only by physicians, veterinarians in the practice of veterinary medicine, clinical laboratories, or hospitals, and only for in vitro clinical or laboratory tests not involving internal or external administration of the material, or the radiation therefrom, to human beings or animals. Its receipt, acquisition, possession, use, and transfer are subject to the regulations and the general license of the U.S. Nuclear Regulatory Commission or of the state with which the Commission has entered into an agreement for the exercise of regulatory authority.

1. Storage of radioactive material should be limited to a specifically designated area.
2. Access to radioactive materials must be limited to authorized personnel only.
3. Do not pipette radioactive material by mouth.
4. Do not eat or drink within designated radioactive work areas.
5. Areas where spills may occur should be wiped up, then washed with an alkali detergent or radiological decontamination solution. Any glassware used must be rinsed completely with water before washing with other laboratory glassware.

For practitioners or institutions receiving radioisotopes under a specific license:

The receipt, use, transfer, and disposal of radioactive materials are subject to the regulations and conditions of your specific license.

**ATTENTION:** Radioactivity printed in the package insert may be slightly different from the radioactivity printed on the box label and on the tracer vial label. The box label and the tracer vial label indicate the actual amount of radioactivity at the calibration date where the package insert indicates the theoretical radioactivity of the kit.



### SCHEME OF THE ASSAY

- 1 - PREPARE REAGENTS. DILUTE SAMPLES 1:51.
- 2 - IDENTIFY COATED TUBES IN DUPLICATE.
- 3 - DISPENSE REAGENTS BY THE FOLLOWING SCHEME AND MIX INCUBATION MIXTURE:

REAGENTS \ TUBES	T	CAL 0-5	DILUTED SAMPLES
CALIBRATORS	-	50 $\mu$ L	-
DILUTED SAMPLES	-	-	50 $\mu$ L
INCUBATION BUFFER	-	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L

- 4 - INCUBATE FOR 2 HOURS AT ROOM TEMPERATURE WHILE SHAKING.
- 5 - ASPIRATE INCUBATION MIXTURE AND WASH TWICE WITH 2 mL WASH BUFFER.
- 6 - DISPENSE 500  $\mu$ L TRACER INTO ALL TUBES.
- 7 - INCUBATE FOR 2 HOURS AT ROOM TEMPERATURE WHILE SHAKING.
- 8 - ASPIRATE TRACER AND WASH TWICE WITH 2 mL WASH BUFFER.
- 9 - MEASURE THE RADIOACTIVITY OF TUBES.

## KIT PER IL DOSAGGIO IMMUNORADIOMETRICO DEGLI ANTICORPI ANTI-TIREOGLOBULINA

### Procedimento per l'analisi quantitativa degli autoanticorpi anti-tireoglobulina umana (IgG anti-hTg) in campioni di siero o plasma umano

Solo per uso in vitro

#### 1. INTRODUZIONE

Le malattie tiroidee autoimmuni comprendono un ampio spettro di patologie che vanno dall'ipotiroidismo (tiroidite di Hashimoto) all'ipertiroidismo (morbo di Graves-Basedow), alle affezioni subcliniche in soggetti asintomatici eutiroidei o ipotiroidei da un punto di vista biochimico. Il legame tra questi estremi è rappresentato dalla presenza di autoanticorpi circolanti diretti contro antigeni tiroidei.

Nella tiroidite autoimmune sono stati descritti tre sistemi antigene-anticorpo distinti – comunemente presenti nel tessuto tiroideo normale – che coinvolgono rispettivamente hTg, un antigene colloidale e uno microsomiale (perossidasi tiroidea).

Il riscontro di autoanticorpi anti-hTg, prevalentemente appartenenti alla classe IgG (IgG anti-hTg), è di grande utilità clinica nella diagnosi delle malattie tiroidee autoimmuni come morbo di Graves-Basedow, tiroidite di Hashimoto e mixedema primario.

Il livello di IgG anti-hTg non è correlato con le concentrazioni di T<sub>3</sub> o di T<sub>4</sub>; infatti questi anticorpi possono essere riscontrati in soggetti eutiroidei oppure ipo- o ipertiroidi.

Le malattie tiroidee autoimmuni sono più frequenti nelle donne, in cui la presenza di autoanticorpi aumenta con l'età, da una prevalenza di circa il 10% intorno a vent'anni, fino al 30% oltre la sessantina. Questi livelli anticorpali possono provocare tiroidite cronica con conseguente ipotiroidismo.

Nel mixedema primario si osservano livelli significativi di autoanticorpi caratteristici degli stadi terminali di tiroidite autoimmune cronica atrofica. Nei pazienti più giovani il riscontro di gozzo e di elevati livelli di autoanticorpi indica generalmente tiroidite di Hashimoto, che è caratterizzata da progressiva riduzione della funzionalità tiroidea con conseguente ipotiroidismo.

Nel morbo di Graves-Basedow, il gozzo tossico è associato a tiroidite cronica, con presenza di elevati livelli di autoanticorpi circolanti.

In tutti i casi il monitoraggio dei livelli di autoanticorpi è utile per la sorveglianza della terapia e per l'identificazione del rischio di sviluppare una malattia autoimmune nei familiari dei soggetti malati.

#### 2. PRINCIPIO DEL DOSAGGIO

Il metodo utilizzato è di tipo immunoradiometrico (IRMA). Nella prima fase le IgG anti-hTg contenute nei calibratori o nei campioni si legano alla hTg adsorbita in fase solida. Nella seconda fase la proteina A marcata con <sup>125</sup>I (tracciante <sup>125</sup>I) aggiunta lega il complesso IgG-hTg in fase solida. Dopo le due incubazioni, la quantità di proteina A marcata legata alla fase solida è proporzionale alla concentrazione di IgG anti-hTg presente nei calibratori o nei campioni. Al termine di ciascuna incubazione il materiale non legato è rimosso mediante aspirazione e lavaggio. Il metodo adottato per la separazione libero/ legato è basato sull'impiego delle provette sensibilizzate, dove la hTg è fissata alle pareti delle provette.

Il dosaggio di anticorpi anti-hTg utilizza come tracciante la proteina A, una proteina della parete cellulare del batterio *Staphylococcus aureus* che ha la capacità di legarsi al frammento Fc delle molecole di IgG.

#### 3. REATTIVI FORNITI NEL KIT

Provette sensibilizzate	100
Tracciante <sup>125</sup> I	1 flacone
Calibratori di anti-hTg	6 flaconi
Siero di controllo	1 flacone
Diluyente campioni	2 flaconi
Tampone di incubazione	1 flacone
Tampone di lavaggio	2 flaconi
Numero di dosaggi	100

**MODALITÀ DI CONSERVAZIONE:** Al momento dell'arrivo, conservare il kit a 2-8°C. Non congelare. Dopo l'apertura, i reattivi di questo kit sono stabili fino alla data di scadenza del kit se conservati in modo adeguato. Il kit è garantito per 4 serie analitiche se utilizzato durante il giorno a temperatura ambiente e conservato durante la notte a 2-8°C.

Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. La data di scadenza del kit è indicata sull'etichetta esterna e corrisponde alla data di scadenza del tracciante. La data di scadenza di ciascun componente è riportata sulle etichette dei rispettivi flaconi.

*Nel ricostituire il contenuto dei flaconi, agitare delicatamente per evitare la formazione di schiuma.*

*Non mescolare reattivi provenienti da lotti differenti.*

### **3.1. Provette sensibilizzate**

La superficie interna di ciascuna provetta è rivestita con hTg biotinilata altamente purificata.

*Al momento dell'uso, portare le provette sensibilizzate a temperatura ambiente prima di aprire il contenitore, per evitare condensazione di umidità.*

*Le provette non utilizzate vanno conservate nel contenitore ben chiuso. Non mescolare lotti differenti di provette sensibilizzate.*

### **3.2. Tracciante <sup>125</sup>I (rosso):** reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 52 mL di proteina A marcata con <sup>125</sup>I, sieroalbumina bovina, tampone fosfato-citrato, conservanti e un colorante rosso inerte. La radioattività massima è 296 kBq (8 µCi) alla data di taratura.

### **3.3. Calibratori di anti-tireoglobulina:** reattivo pronto per l'uso

Ogni flacone contiene 0,5 mL di siero umano prediluito contenente IgG anti-hTg, siero di vitello, sieroalbumina bovina, tampone PBS e conservanti. Le concentrazioni dei calibratori sono le seguenti: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 IU/mL. I calibratori del kit sono tarati contro lo Standard Internazionale MRC 65/93. *I calibratori del kit sono commutabili con i campioni in esame quando sono utilizzati con i reattivi e la procedura operativa di questo test diagnostico in vitro, secondo quanto raccomandato dal fabbricante.*

*Poiché i calibratori sono stati prediluiti 1:51 e ne sono stati determinati i rispettivi valori, la concentrazione dei campioni in IU/mL può essere calcolata direttamente per interpolazione dalla curva di taratura. È necessario introdurre un fattore di moltiplicazione solo se la diluizione del campione è superiore a 1:51.*

### **3.4. Siero di controllo:** reattivo liofilo

Il flacone contiene siero umano prediluito, anticorpi anti-tireoglobulina, siero di vitello, sieroalbumina bovina, tampone PBS e conservanti. Il range delle concentrazioni di ogni controllo è riportato sul certificato di analisi ed indica i limiti stabiliti da DiaSorin per i valori di controllo ottenibili in sessioni di analisi affidabili.

Ricostituire il contenuto del flacone con 1 mL di acqua distillata. La soluzione risultante è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit. Si raccomanda di *non diluire ulteriormente* il siero di controllo. Leggere direttamente il valore dalla curva di taratura.

### **3.5. Diluente campioni:** reattivo pronto per l'uso

Ogni flacone contiene 50 mL di tampone PBS, siero di vitello, sieroalbumina bovina e conservanti.

*Il reattivo è comune ai kit AB-TPOK-3 e AB-HTGK-3.*

### **3.6. Tampone di incubazione (blu):** reattivo pronto per l'uso

Il flacone contiene 52 mL di soluzione di tampone TRIS, sieroalbumina bovina, detergenti, conservanti e un colorante blu inerte.

### **3.7. Tampone di lavaggio:** reattivo in soluzione (10x)

Ogni flacone contiene 50 mL di Triton X-100 allo 0,5% e soluzione fisiologica salina.

Portare a volume di 500 mL con acqua deionizzata l'intero contenuto di ogni flacone. La soluzione risultante è stabile a 2-8°C fino alla data di scadenza del kit. La soluzione viene utilizzata per il lavaggio delle provette.

## **4. ATTREZZATURE E REATTIVI AUSILIARI**

- Acqua distillata e deionizzata.
- Vetreria.
- Provette in plastica monouso.
- Micropipette con puntali monouso da 10, 50 µL (esattezza ± 3%, precisione 2%) e 500, 1000 µL (esattezza ± 2%, precisione 1%).
- Portaprovette.
- Agitatore Vortex.
- Agitatore rotante con velocità di agitazione di 300-350 rpm.
- Sistema per distribuire e aspirare il tampone di lavaggio in grado di distribuire 2-3 mL per ciclo di lavaggio durante due cicli di lavaggio.
- Contatore gamma per contare lo iodio <sup>125</sup>I (impostazione della finestra del contatore: 15-80 keV - efficienza del contatore: 70% - tempo di conteggio: 1 min). Se l'efficienza del contatore è inferiore al 60%, si deve prolungare il tempo di conteggio a 2 min.

## 5. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio può essere effettuato in campioni di siero o plasma umano. Possono essere utilizzati anticoagulanti come citrato, EDTA e eparina. Prelevare il sangue per puntura venosa, lasciarlo coagulare e separare il siero dal coagulo al più presto. Chiarificare per filtrazione o centrifugazione prima del test i campioni che presentano materiale in sospensione, opalescenza, lipemia o residui eritrocitari. Non usare campioni fortemente emolizzati o lipemici, né campioni che presentano materiale in sospensione o evidente contaminazione microbica. Se il dosaggio è eseguito nelle 24 ore successive al prelievo, i campioni possono essere conservati a 2-8°C. In caso contrario, devono essere suddivisi in aliquote congelate a -20°C o a temperature inferiori. Se i campioni sono stati scongelati, agitare con cura prima di dosarli. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento.

### Diluizione dei campioni

Diluire i campioni 1:51 con il diluente campioni (3.5) prima del dosaggio. Distribuire 10 µL di campione e 500 µL di diluente campioni in provette di plastica e agitare su Vortex. Se si prevedono concentrazioni elevate di IgG anti-hTg, diluire ulteriormente con il diluente campioni. *Calibratori e siero di controllo sono pronti per l'uso e non devono essere diluiti.*

## 6. PROCEDIMENTO OPERATIVO

Portare i reattivi a temperatura ambiente (20-25°C) prima del dosaggio. Prevedere determinazioni almeno in duplicato. Eseguire la determinazione dei calibratori per ogni serie di campioni analizzati. Il procedimento operativo deve essere rigorosamente identico per calibratori e campioni in esame. Eseguire le fasi del dosaggio nell'ordine previsto, senza interruzioni.

Utilizzare un puntale monouso nuovo per dispensare calibratori e campioni.

- Distribuire i reattivi *sul fondo delle provette sensibilizzate*. Operare secondo lo schema seguente:

reattivi \ provette	Calibratori 0-5	Campioni diluiti
Calibratori	50 µL	-
Campioni diluiti	-	50 µL
Tampone di incubazione	500 µL	500 µL

- **Agitare** il contenuto delle provette e **incubare per 2 ore a temperatura ambiente** sotto agitazione (300-350 rpm).
- **Aspirare** accuratamente la miscela di incubazione e **lavare** due volte con 2 mL di tampone di lavaggio. *Verificare che l'eliminazione del liquido sia completa, assicurandosi che il puntale della pipetta di aspirazione tocchi il fondo delle provette sensibilizzate. La presenza di gocce aderenti alle pareti delle provette sensibilizzate può provocare scarsa riproducibilità o risultati non affidabili. Non deve restare traccia del colorante.*
- **Distribuire 500 µL di tracciante** in tutte le provette. Preparare due provette non sensibilizzate per il calcolo dell'attività totale contenenti solamente 500 µL di tracciante e lasciare da parte fino al momento del conteggio.
- **Incubare per 2 ore a temperatura ambiente** sotto agitazione (300-350 rpm).
- **Aspirare** accuratamente il tracciante e lavare due volte con 2 mL di tampone di lavaggio. Operare come sopra.
- **Misurare la radioattività** delle provette.

## 7. CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolare la media dei conteggi per ogni gruppo di provette, dopo aver sottratto il valore del fondo. Esprimere la media dei conteggi di calibratori e campioni come percentuale rispetto all'attività totale:

$$B/T\% = \frac{\text{conteggio medio calibratori o campioni}}{\text{conteggio medio attività totale}} \times 100$$

Riportare su grafico log-log la percentuale media calcolata per ciascun calibratore sulle ordinate (asse delle y) in funzione della concentrazione di IgG anti-hTg espressa in IU/mL sulle ascisse (asse delle x). Si ottiene così una curva di taratura (Fig. 1). Direttamente dalla curva di taratura leggere la concentrazione di IgG anti-hTg di ciascun campione espressa in IU/mL. Se il campione è stato diluito oltre il fattore iniziale di 1:51, la concentrazione di IgG anti-hTg trovata deve essere moltiplicata per il fattore di diluizione superiore a 1:51, tenendo presente che i calibratori sono già prediluiti 1:51.

### Esempio di calcolo

I dati seguenti devono essere considerati solo un esempio e non devono essere usati in luogo dei dati ottenuti dall'utilizzatore.

Descrizione	cpm	B/T x 100
Attività totale	78.581	–
Calibratore zero/diluente campioni	85	–
100 IU/mL	1.313	1,6
200 IU/mL	2.663	3,3
500 IU/mL	6.445	8,2
1500 IU/mL	19.955	25,3
6500 IU/mL	40.869	52,0
Campione	2.977	3,7

Interpolando dalla curva di taratura, il campione risulta contenere 230 IU/mL di IgG anti- hTg.

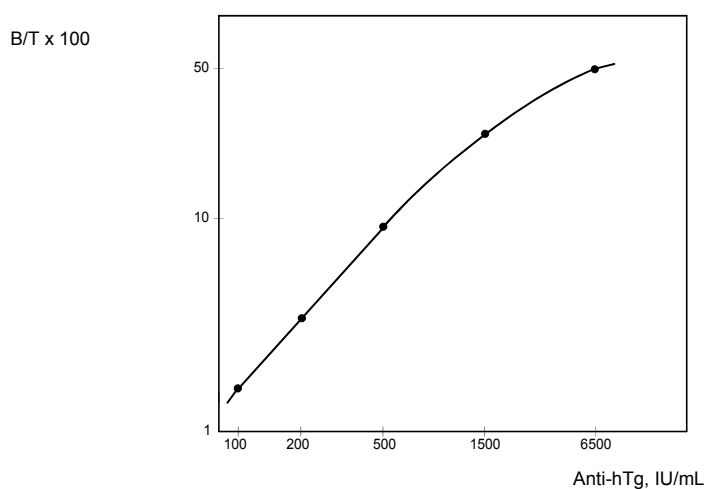


Fig. 1

### Interpretazione dei risultati

Il primo calibratore (100 IU/mL) rappresenta il cut-off del sistema.

Si considerano positivi per la presenza di IgG anti-hTg i campioni con valore uguale o maggiore del cut-off. I campioni con valore inferiore al cut-off sono da considerare negativi.

*Tuttavia, si suggerisce di considerare dubbi i campioni con valori di IgG anti-hTg compresi entro  $\pm 20\%$  del cut-off.*

*Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.*

### 8. DATI CLINICI

Durante gli studi clinici sono stati presi in considerazione 211 soggetti. In questa popolazione i soggetti sono stati classificati negativi, positivi e dubbi con un test di riferimento. Con il kit DiaSorin il 96% dei soggetti classificati negativi presenta valori di IgG anti-hTg inferiori a 100 IU/mL e il 100% dei soggetti classificati positivi presenta valori di IgG anti- hTg superiori a 100 IU/mL.

Tuttavia, i valori riportati qui sopra sono solamente indicativi. Si raccomanda a ciascun laboratorio di stabilire i propri intervalli di riferimento.

## 9. PRESTAZIONI METODOLOGICHE DEL KIT

### 9.1. Specificità analitica

La specificità analitica è definita come la capacità del test di rilevare esattamente l'analita in presenza di fattori potenzialmente interferenti nella matrice del campione (per esempio, anticoagulanti, emolisi, effetti di trattamenti del campione) o di reazioni crociate con analiti potenzialmente interferenti.

**Interferenze.** Studi controllati su fattori potenzialmente interferenti hanno dimostrato che le prestazioni del test non sono influenzate da anticoagulanti (citrato, EDTA, eparina), lieve emolisi (fino a 20 mg/dL di emoglobina), lipemia (fino a 10000 mg/dL di trigliceridi), bilirubinemia (fino a 50 mg/dL di bilirubina).

**Reazioni crociate.** L'uso di hTg estremamente purificata per la sensibilizzazione delle provette riduce la possibilità di interferenze dovute a proteine aspecifiche. Non si sono osservate reazioni crociate dovute alla presenza di autoanticorpi anti-TPO fino ad una concentrazione di 1000 U/mL.

### 9.2. Sensibilità analitica

La sensibilità analitica può essere espressa anche come limite di rilevazione, ossia la quantità minima di analita rilevabile dal test. Il limite di rilevazione è 6 IU/mL al 95% di confidenza. È stato calcolato come la concentrazione apparente di analita distinguibile dal calibratore zero (diluente campioni), ossia due deviazioni standard sopra lo zero.

### 9.3. Precisione

La ripetibilità e la riproducibilità del saggio (ossia la variabilità intra-saggio e inter-saggio) sono state determinate utilizzando dei campioni di riferimento a diverse concentrazioni di analita.

Ripetibilità	A	B	C
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (IU/mL)	115	951	2924
Deviazione standard	3,3	42,7	105,0
Coefficiente di variazione (%)	2,9	4,4	3,6

Riproducibilità	A	D	E
Numero di determinazioni	10	10	10
Media (IU/mL)	119	793	2361
Deviazione standard	13,9	53,0	177,0
Coefficiente di variazione (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Esattezza

L'esattezza del dosaggio è stata controllata mediante il test di diluizione.

**Test di diluizione.** Sono state dosate diluizioni scalari di due sieri a concentrazione elevata di IgG anti-hTg effettuate nel diluente campioni.

Diluizione	Concentrazione attesa, IU/mL	Concentrazione misurata, IU/mL	% Recupero
in toto	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
in toto	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,40	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Effetto saturazione ad alte dosi

Quando si dosano campioni contenenti concentrazioni anticorpali estremamente elevate in un metodo *sandwich* con due incubazioni, è possibile ottenere dei livelli apparenti di anticorpo inferiori al reale per effetto della saturazione. Un sistema ben ottimizzato esclude però che si ottengano risultati grossolanamente sottostimati (come si può verificare nei dosaggi *sandwich* con una incubazione).

Si sono dosate concentrazioni di IgG anti-hTg fino a 100 mila IU/mL e si è osservato che queste concentrazioni generano un segnale analitico sempre superiore al calibratore più concentrato (curva a saturazione). Per una corretta quantificazione, i campioni contenenti livelli di IgG anti-hTg maggiori di quello del calibratore più concentrato vanno diluiti con il diluente campioni e ridosati. I risultati vanno quindi moltiplicati per il fattore di diluizione superiore a 1:51 per ottenere i livelli di IgG anti-hTg dei campioni non diluiti.

### 10. LIMITI DEL DOSAGGIO

L'uso del dosaggio radioimmunologico ha drasticamente ridotto i risultati falsi positivi. Tuttavia, la diagnosi non deve essere formulata sulla base del risultato di un singolo dosaggio, ma questo deve essere valutato insieme ad altri riscontri clinici, procedure diagnostiche e al giudizio del medico.

Contaminazione batterica o cicli ripetuti di congelamento/scongelamento dei campioni possono modificare i risultati del dosaggio.

Per ottenere risultati affidabili è necessario attenersi strettamente alle istruzioni per l'uso e possedere una adeguata manualità tecnica. In particolare è essenziale una buona precisione nelle fasi di ricostituzione e distribuzione dei reattivi e in quelle di aspirazione e lavaggio.

Risultati non riproducibili sono dovuti principalmente a fattori metodologici, come ad esempio:

- scambio di capsule tra i flaconi
- uso dello stesso puntale per i prelievi da flaconi diversi o da campioni diversi
- flaconi lasciati aperti per lunghi periodi di tempo
- esposizione dei reattivi o campioni a calore intenso o a forti sorgenti di inquinamento batterico
- aspirazione della miscela di incubazione e lavaggio delle provette non adeguati
- contaminazione del bordo delle provette con il tracciante o con i campioni
- oscillazioni casuali o cattiva manutenzione del contatore gamma
- scambio di reattivi provenienti da lotti diversi.

### 11. AVVERTENZE E PRECAUZIONI

I componenti del kit contengono sodio azide come conservante. Poiché la sodio azide può formare azidi di piombo o di rame esplosive nelle tubature, si raccomanda di far fluire acqua in abbondanza negli scarichi dopo l'eliminazione di soluzioni contenenti sodio azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocivo per ingestione.

R 31 – A contatto con acidi libera gas tossico.

S 28 – In caso di contatto con la pelle lavarsi immediatamente ed abbondantemente con acqua.

S 45 – In caso di incidente o di malessere consultare immediatamente il medico (se possibile, mostrargli l'etichetta).

Tutte le unità di siero e plasma utilizzate per la fabbricazione dei componenti di questo kit sono state analizzate e trovate non reattive per HBsAg, anti-HCV e per anti-HIV-1/2. Tuttavia, poiché nessun metodo può dare assoluta certezza che siano assenti agenti patogeni, tutto il materiale di origine umana dovrebbe essere considerato potenzialmente infettivo e manipolato come tale.

### 12. REGOLE DI SICUREZZA

- Non mangiare, bere, fumare o applicare cosmetici durante l'esecuzione del dosaggio.
- Non pipettare con la bocca.
- Evitare il contatto diretto con il materiale potenzialmente infetto indossando indumenti da laboratorio, occhiali protettivi e guanti monouso. Lavare accuratamente le mani al termine del dosaggio.
- Evitare di provocare schizzi o aerosol. Ogni goccia di reattivo biologico deve essere rimossa con una soluzione di sodio ipoclorito al 5% ed il mezzo utilizzato deve essere trattato come materiale di rifiuto infetto.
- Tutti i campioni, tutti i reattivi biologici del kit e tutti i materiali usati per effettuare il saggio devono essere considerati in grado di trasmettere agenti infettivi; pertanto i rifiuti devono essere smaltiti secondo le disposizioni legislative e la regolamentazione vigente in ciascun Paese. Il materiale monouso deve essere incenerito; i rifiuti liquidi devono essere decontaminati con sodio ipoclorito ad una concentrazione finale del 5% per almeno mezz'ora. Qualsiasi materiale che deve essere riutilizzato va trattato in autoclave con un approccio di *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente si considera che un'ora a 121°C sia un tempo di sterilizzazione adeguato; tuttavia si raccomanda a ciascun utilizzatore di verificare l'efficacia del ciclo di decontaminazione mediante una convalida iniziale e l'uso routinario di indicatori biologici.

### 13. REGOLE DI BASE DI RADIOPROTEZIONE

#### Reagenti contenenti iodio-125

Questo kit contiene materiale radioattivo che non supera 8,12  $\mu\text{Ci}$  (300 kBq) di iodio-125. Adottare precauzioni adeguate e le buone pratiche di laboratorio per la conservazione, la manipolazione e lo smaltimento di questo materiale.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza generale:

Questo materiale radioattivo può essere consegnato, acquisito, conservato e usato unicamente da personale medico, veterinari abilitati alla pratica di medicina veterinaria, laboratori clinici o ospedali e unicamente per test in vitro clinici o di laboratorio che non prevedano la somministrazione interna o esterna del materiale, o di radiazioni da esso derivanti, su persone o animali. L'acquisto, il possesso, la conservazione, l'uso e il trasferimento sono soggetti alle norme e alla licenza generale della Nuclear Regulatory Commission statunitense dello stato con cui la Commissione ha stipulato un accordo per l'esercizio dell'autorità normativa.

1. La conservazione del materiale radioattivo deve essere limitata ad un'area specificatamente designata.
2. L'accesso ai materiali radioattivi deve essere limitato esclusivamente al personale autorizzato.
3. Non usare la bocca per versare con la pipetta materiale radioattivo.
4. Non mangiare o bere nelle aree di lavoro designate per materiale radioattivo.
5. Le zone dove possono verificarsi perdite devono essere pulite, quindi lavate con detergente alcalino o soluzione per la decontaminazione radiologica. Tutti gli oggetti in vetro usati devono essere accuratamente risciacquati con acqua prima di lavarli con altri oggetti in vetro del laboratorio.

Per i professionisti o gli istituti che utilizzano radioisotopi con una licenza specifica:

L'acquisto, l'uso, il trasferimento e lo smaltimento di materiali radioattivi sono soggetti alle norme e alle condizioni della licenza specifica.

**ATTENZIONE:** La radioattività stampata sulle istruzioni allegate alla confezione può essere leggermente diversa dalla radioattività stampata sull'etichetta della scatola e sull'etichetta della fiala di tracciante. L'etichetta sulla scatola e sulla fiala di tracciante indicano la quantità effettiva di radioattività alla data di calibrazione, mentre il materiale informativo della confezione indica la radioattività teorica del kit.

#### SCHEMA DEL DOSAGGIO

- 1 - PREPARARE I REATTIVI. DILUIRE I CAMPIONI 1:51.
- 2 - CONTRASSEGNARE LE PROVETTE SENSIBILIZZATE IN DUPLICATO.
- 3 - DISTRIBUIRE I REATTIVI SECONDO LO SCHEMA SEGUENTE ED AGITARE LA MISCELA DI REAZIONE:

REATTIVI \ PROVETTE	T	CAL 0-5	CAMPIONI DILUITI
CALIBRATORI	—	50 $\mu\text{L}$	—
CAMPIONI DILUITI	—	—	50 $\mu\text{L}$
TAMPONE DI INCUBAZIONE	—	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$

- 4 - INCUBARE PER 2 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE SOTTO AGITAZIONE.
- 5 - ASPIRARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE E LAVARE 2 VOLTE CON 2 mL DI TAMPONE DI LAVAGGIO.
- 6 - DISTRIBUIRE 500  $\mu\text{L}$  DI TRACCIANTE IN TUTTE LE PROVETTE.
- 7 - INCUBARE PER 2 ORE A TEMPERATURA AMBIENTE SOTTO AGITAZIONE.
- 8 - ASPIRARE LA MISCELA DI INCUBAZIONE E LAVARE 2 VOLTE CON 2 mL DI TAMPONE DI LAVAGGIO.
- 9 - MISURARE LA RADIOATTIVITÀ DELLE PROVETTE.



## TROUSSE POUR LE DOSAGE IMMUNORADIOMETRIQUE DES ANTICORPS ANTI-THYROGLOBULINE

### Technique pour la détermination quantitative des auto-anticorps anti-thyroglobuline humaine (IgG anti-hTg) dans le sérum ou le plasma humain

Usage in vitro

#### 1. INTRODUCTION

Les maladies thyroïdiennes auto-immunes comprennent un vaste éventail de pathologies, de l'hypothyroïdie (thyroïdite de Hashimoto) à l'hyperthyroïdie (maladie de Basedow), et aux affections ne présentant aucune manifestation clinique chez des sujets asymptomatiques euthyroïdiens ou hypothyroïdiens d'un point de vue biochimique. Le lien entre ces extrêmes se traduit par la présence d'auto-anticorps circulants, dirigés contre des antigènes thyroïdiens.

Pour la thyroïdite auto-immune, on a décrit trois systèmes antigène-anticorps distincts, habituellement présents dans le tissu thyroïdien normal, impliquant respectivement l'hTg, un antigène colloïdal et un antigène microsomal (peroxydase thyroïdienne).

La détermination de la présence d'auto anticorps anti-hTg, appartenant principalement à la classe IgG (IgG anti-hTg) est d'une grande utilité clinique dans le diagnostic des maladies thyroïdiennes auto-immunes comme la maladie de Basedow, la thyroïdite de Hashimoto et le myxoedème idiopathique.

Le niveau d'IgG anti-hTg n'est pas corrélé avec les concentrations de T<sub>3</sub> ou de T<sub>4</sub>. En effet on peut trouver ces anticorps chez des sujets euthyroïdiens, hypothyroïdiens ou hyperthyroïdiens.

Les maladies thyroïdiennes auto-immunes sont plus fréquentes chez les femmes, où la présence d'auto-anticorps augmente avec l'âge, de 10% environ autour de vingt ans jusqu'à 30% après la soixantaine. Ces niveaux d'anticorps peuvent provoquer une thyroïdite chronique entraînant une hypothyroïdie.

On relève dans le myxoedème idiopathique des niveaux significatifs d'auto-anticorps, caractéristiques des stades finaux de thyroïdite auto-immune chronique et atrophique. Chez les sujets plus jeunes, la présence d'un goitre et de niveaux élevés d'auto-anticorps est généralement le signe d'une thyroïdite de Hashimoto, caractérisée par une réduction progressive de la fonction thyroïdienne causant une hypothyroïdie.

Dans la maladie de Basedow, le goitre toxique est associé à une thyroïdite chronique confirmée par des niveaux élevés d'auto-anticorps circulants.

Dans tous les cas, le suivi des niveaux d'auto-anticorps est utile pour surveiller la thérapie et identifier le risque de développement d'une maladie auto-immune dans la famille des sujets malades.

#### 2. PRINCIPE DU DOSAGE

La méthode utilisée est de type immunoradiométrique (IRMA). Pendant la première phase, les IgG anti-hTg contenues dans les étalons ou les échantillons se fixent à l'hTg adsorbée en phase solide. Pendant la deuxième phase, la protéine A marquée à l'<sup>125</sup>I (traceur <sup>125</sup>I) est ajoutée et se fixe au complexe IgG-hTg sur la phase solide. Après les deux incubations, la quantité de protéine A marquée liée à la phase solide est proportionnelle à la concentration d'IgG anti-hTg présente dans les étalons ou les échantillons. A la fin de chaque incubation, le traceur non fixé est éliminé par aspiration et par lavage. Le moyen de séparation lié/libre est basé sur l'emploi de tubes revêtus sur les parois desquels l'hTg est fixée.

Le traceur employé dans le dosage des anticorps anti-hTg est la protéine A, composant de la paroi cellulaire de la bactérie *Staphylococcus aureus* ayant la propriété de se fixer au fragment Fc des IgG.

#### 3. REACTIFS FOURNIS DANS LA TROUSSE

Tubes revêtus	100
Traceur <sup>125</sup> I	1 flacon
Etalons anti-hTg	6 flacons
Sérum de contrôle	1 flacon
Diluant pour échantillons	2 flacons
Tampon d'incubation	1 flacon
Tampon de lavage	2 flacons
Nombre de dosages	100

**STOCKAGE:** Conserver la trousse à 2-8°C dès réception. Ne pas congeler. Après l'ouverture, les réactifs de cette trousse restent stables jusqu'à la date de péremption de la trousse, s'ils sont conservés de manière adéquate. La trousse est garantie pour réaliser 4 séries analytiques si elle est utilisée pendant le jour à température ambiante et conservée pendant la nuit à 2-8°C.

*Ne pas utiliser les réactifs ayant dépassé la date de péremption. La date de péremption de la trousse est indiquée sur l'étiquette extérieure et correspond à la date de péremption du traceur. La date de péremption de chaque composant est reportée sur les étiquettes des flacons respectifs.*

*Agiter doucement les flacons lors de la reconstitution de leur contenu, afin d'éviter la formation de mousse.*

*Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.*

### **3.1. Tubes revêtus**

La surface interne de chaque tube est revêtue d'hTg biotynilée hautement purifiée.

*Au moment de l'emploi, amener les tubes revêtus à température ambiante avant d'ouvrir leur boîte, afin d'éviter tout phénomène de condensation.*

*Conservé les tubes non utilisés dans la boîte en s'assurant que celle-ci est dûment fermée. Ne pas mélanger des tubes revêtus provenant de lots différents.*

### **3.2. Traceur <sup>125</sup>I (rouge): réactif prêt à l'emploi**

Le flacon contient 52 mL de protéine A marquée à l'<sup>125</sup>I, de la sérumalbumine bovine, du tampon phosphaté-citraté, des conservateurs et un colorant rouge inerte. La radioactivité maximale est de 296 kBq (8 µCi) à la date d'étalonnage.

### **3.3. Etalons anti-thyroglobuline: réactif prêt à l'emploi**

Chaque flacon contient 0,5 mL de sérum humain pré-dilué contenant des IgG anti-hTg, du sérum de veau, de la sérumalbumine bovine, du tampon PBS et des conservateurs. Les concentrations des étalons sont les suivantes: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 UI/mL. Les étalons de la trousse sont étalonnés par rapport au Standard International MRC 65/93. *Les étalons de la trousse sont commutables avec les échantillons examinés s'ils sont utilisés avec les réactifs et le mode opératoire de ce test diagnostique in vitro, d'après les recommandations du fabricant.*

*Les étalons ayant été pré-dilués au 1/51 et leurs valeurs respectives déterminées, la concentration en UI/mL des échantillons peut être calculée directement par interpolation de la courbe d'étalonnage. Le facteur de multiplication n'est nécessaire que si l'on a effectué une dilution de l'échantillon supérieure au 1/51.*

### **3.4. Sérum de contrôle: réactif lyophilisé**

Le flacon contient des anticorps anti-thyroglobuline dans du sérum pré-dilué d'origine humaine, du sérum de veau, de la sérumalbumine bovine, du tampon PBS et des conservateurs. La plage de concentrations pour chaque contrôle est indiquée dans le certificat d'analyse et indique les limites établies par DiaSorin pour les valeurs de contrôle qui peuvent être obtenues dans des séries analytiques fiables.

Reconstituer le contenu du flacon avec 1 mL d'eau distillée. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption de la trousse. *Ne pas diluer de nouveau* le sérum de contrôle. Lire directement la valeur de la courbe d'étalonnage.

### **3.5. Diluant pour échantillons: réactif prêt à l'emploi**

Chaque flacon contient 50 mL de tampon PBS, du sérum de veau, de la sérumalbumine bovine et des conservateurs.

*Le réactif est commun aux trousse AB-TPOK-3 et AB-HTGK-3.*

### **3.6. Tampon d'incubation (bleu): réactif prêt à l'emploi**

Le flacon contient 52 mL de solution de tampon TRIS, de la sérumalbumine bovine, des détergents, des conservateurs et un colorant bleu inerte.

### **3.7. Tampon de lavage: réactif en solution (10x)**

Chaque flacon contient 50 mL de Triton X-100 à 0,5% et de la solution saline physiologique.

Compléter le contenu total de chaque flacon avec de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre un volume de 500 mL. La solution ainsi obtenue reste stable à 2-8°C jusqu'à la date de péremption de la trousse et est utilisée pour le lavage des tubes.

## **4. PRECAUTIONS D'UTILISATION**

Certains réactifs contenus dans cette trousse renferment de l'azide de sodium. Ce sel peut réagir avec les installations sanitaires en plomb ou cuivre et former des azides métalliques extrêmement explosives. Pour évacuer ces réactifs, rincer à grande eau afin d'éviter les accumulations d'azide (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocif en cas d'ingestion.

R 31 – Au contact d'un acide, dégage un gaz toxique.

S 28 – Après contact avec la peau, se laver immédiatement et abondamment avec de l'eau.

S 45 – En cas d'accident ou de malaise, consulter immédiatement un médecin (si possible, lui montrer l'étiquette).

Toutes les unités de sérum et de plasma utilisées pour la fabrication des composants de cette trousse ont été analysées et ont été trouvées négatives en Ag HBs, en anticorps anti-VHC et en anticorps anti-HIV-1/2. Toutefois, puisqu'il n'existe aucune méthode garantissant l'absence totale d'agents pathogènes, on doit considérer tout matériau d'origine humaine comme étant potentiellement infectieux. C'est pourquoi il faudra le manipuler avec précaution.

## 5. REGLES DE SECURITE

- Ne pas manger, ni boire, ni fumer ou se maquiller pendant le dosage.
- Ne pas pipeter avec la bouche.
- Eviter le contact direct avec le matériel potentiellement infectieux en portant des vêtements de laboratoire, des lunettes de protection et des gants à usage unique. Se laver soigneusement les mains à la fin du dosage.
- Eviter de provoquer des éclaboussures ou des vaporisations. Si cela arrivait, chaque goutte de réactif doit être nettoyée avec une solution d'hypochlorite de sodium à 5% et traitée comme du matériel infectieux.
- Tous les échantillons, tous les réactifs biologiques de la trousse et tout le matériel utilisés pour effectuer l'essai doivent être considérés comme capables de transmettre des agents étiologiques. Toute élimination de déchets se fera conformément aux réglementations en vigueur. Le matériel à usage unique doit être incinéré; les déchets liquides doivent être décontaminés avec de l'hypochlorite de sodium à concentration finale de 5% pendant au moins une demi-heure. Tout matériel réutilisable doit être stérilisé en autoclave par un traitement à l'excès (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). On considère qu'un temps de stérilisation d'une heure à 121°C est convenable. Nous conseillons toutefois à chaque laboratoire de vérifier l'efficacité du cycle de décontamination en effectuant un contrôle au début et en utilisant de façon régulière les indicateurs biologiques.

## 6. REGLES DE BASE DE RADIOPROTECTION

### Réactifs contenant de l'iode 125

Cette trousse contient un produit radioactif qui ne dépasse pas 8,12 µCi (300 kBq) d'iode-125. Les précautions appropriées et les bonnes pratiques de laboratoire doivent être utilisées pour la conservation, la manipulation et la mise au rebut de ce produit.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence générale :

Ce produit radioactif peut être reçu, réceptionné, détenu et utilisé uniquement par des médecins, des laboratoires cliniques, des hôpitaux, des vétérinaires et des centres de recherche dans le cadre de la pratique de médecine vétérinaire, de laboratoires cliniques ou des hôpitaux, et uniquement pour des analyses cliniques ou de laboratoire in vitro n'impliquant pas l'administration interne ou externe du produit, ni par rayonnement, à l'homme ou à l'animal. Sa réception, son acquisition, sa détention, son utilisation et son transfert sont sujets aux réglementations et à la licence générale de l'U.S. Nuclear Regulatory Commission de l'État avec lequel la Commission a conclu un accord pour l'exercice de l'autorité réglementaire.

1. Le produit radioactif doit être conservé à un endroit désigné.
2. L'accès aux produits radioactifs doit être limité au personnel autorisé uniquement.
3. Ne pas pipeter des solutions radioactives avec la bouche.
4. Ne pas manger, ni boire dans les zones de travail radioactives.
5. En cas de déversement de produits radioactifs dans une zone, nettoyer la zone, puis la laver à l'aide d'un produit détergent à base d'alcali ou d'une solution de décontamination radioactive. Tout article de verre utilisé doit être entièrement lavé à l'eau avant de laver les autres articles de verre du laboratoire.

Pour les praticiens ou les établissements recevant des radio-isotopes dans le cadre d'une licence spécifique :

La réception, l'utilisation, le transfert et la mise au rebut de produits radioactifs sont sujets aux réglementations et conditions de votre licence spécifique.

**ATTENTION** : La radioactivité imprimée sur la notice d'utilisation peut être légèrement différente de celle qui est imprimée sur l'étiquette de la boîte et sur l'étiquette du flacon du traceur. Les étiquettes de la boîte et du flacon du traceur indiquent la dose réelle de radioactivité à la date de calibrage, alors que la notice d'utilisation indique la radio-activité théorique de la trousse.

### Déchets radioactifs

Tout utilisateur ou détenteur de radioéléments en sources scellées ou non scellées en est responsable et comptable devant les autorités de Santé Publique et, de ce fait, n'est pas autorisé à s'en dessaisir par d'autres voies que celles définies par les procédures réglementaires. Les modalités d'élimination des déchets radioactifs provenant de sources non scellées sont définies par l'avis aux utilisateurs paru au Journal Officiel du 6 juin 1970. Conformément aux dispositions de cet avis et du décret N° 86-1103 du 2 octobre 1986 relatif à la protection des travailleurs contre les dangers des rayonnements ionisants paru au Journal Officiel du 12 octobre 1986, l'OPRI<sup>(1)</sup> et les organismes désignés par lui sont seuls habilités à procéder à la prise en charge des déchets radioactifs correspondants. Les laboratoires de notre filiale en France sont autorisés à céder les trousseaux conformément aux instructions de l'Arrêté du 3 avril 2002 et dans le respect de la réglementation sur le transport de matériel radioactif.

<sup>(1)</sup>O.P.R.I. BP 35 - 78110 Le Vésinet.

## 7. MATERIEL NECESSAIRE, MAIS NON FOURNI

- Eau distillée et déminéralisée.
- Bêchers.
- Tubes en polystyrène à usage unique.
- Micropipettes avec embouts à usage unique de 10, 50 µL (justesse ± 3%, fidélité 2%) et 500, 1000 µL (justesse ± 2%, fidélité 1%).
- Portoir pour tubes.
- Mélangeur Vortex.
- Agitateur rotatif avec une vitesse de rotation de 300-350 tours/min.
- Système de distribution et d'aspiration du tampon de lavage capable de distribuer 2-3 mL par cycle de lavage pendant deux cycles de lavage.
- Compteur gamma pour compter l'iode <sup>125</sup>I (définition de la fenêtre du compteur: 15-80 keV - efficacité du compteur: 70% - temps de comptage: 1 min). Si l'efficacité du compteur est inférieure à 60%, le temps de comptage doit être prolongé à 2 min.

## 8. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le dosage peut être effectué sur du sérum ou du plasma humain. On peut employer des anticoagulants comme le citrate, l'EDTA ou l'héparine. Pour obtenir le sérum prélever le sang par piqûre intraveineuse, le laisser coaguler et séparer le sérum du caillot dès que possible. Clarifier par filtration ou centrifugation avant le test les échantillons troubles, lipémiques et ceux contenant du matériel en suspension ou des déchets érythrocytaires. Ne pas utiliser des échantillons fortement hémolysés ou lipémiques, ni des échantillons contenant des particules en suspension ou une contamination microbienne évidente. Si le dosage est exécuté dans les 24 heures suivant le prélèvement, les échantillons peuvent être conservés à 2-8°C. Dans le cas contraire, ils doivent être aliquotés et congelés à -20°C ou à des températures plus basses. Si les échantillons ont été congelés, attendre qu'ils soient complètement décongelés et les homogénéiser avant le dosage. Il faut éviter les cycles de congélation/décongélation répétés.

### Dilution des échantillons

Les échantillons doivent être dilués au 1/51 avec le diluant pour échantillons (3.5) avant le dosage. Distribuer 10 µL d'échantillon et 500 µL de diluant pour échantillons dans des tubes en plastique, puis mélanger au Vortex.

Si l'on prévoit des concentrations élevées d'IgG anti-hTg, diluer de nouveau avec le diluant pour échantillons. *Les étalons et le sérum de contrôle sont prêts à l'emploi et ne doivent pas être dilués.*

## 9. MODE OPERATOIRE

Amener les réactifs à température ambiante (20-25°C) avant le dosage. Effectuer le dosage au moins en doublets. Les étalons doivent être dosés avec chaque série d'échantillons examinés. Le mode opératoire doit être rigoureusement identique pour les étalons et les échantillons à tester.

Exécuter toutes les phases du dosage dans l'ordre prévu, sans interruption. Utiliser un embout à usage unique neuf pour distribuer les étalons et les échantillons.

- Distribuer les réactifs *au fond des tubes revêtus*. Procéder d'après le schéma suivant:

réactifs \ tubes	Etalons 0-5	Echantillons dilués
Etalons	50 µL	–
Echantillons dilués	–	50 µL
Tampon d'incubation	500 µL	500 µL

- **Agiter** le contenu des tubes puis **incuber pendant 2 heures à température ambiante** en agitation (300-350 tours/min).
- **Aspirer** soigneusement le mélange d'incubation puis **rincer** deux fois avec 2 mL de tampon de lavage. *Vérifier que le liquide soit éliminé complètement: pour cela il faut s'assurer que l'embout de la pipette d'aspiration touche le fond des tubes revêtus. La présence de gouttes adhérant aux parois des tubes revêtus peut entraîner une mauvaise reproductibilité ou fausser les résultats. Le colorant doit disparaître totalement.*
- **Distribuer 500 µL de traceur** dans tous les tubes. Préparer deux tubes non revêtus ne contenant que 500 µL de traceur pour le calcul de l'activité totale et les mettre de côté en attendant la phase du calcul de la radioactivité.
- **Incuber pendant 2 heures à température ambiante** en agitation (300-350 tours/ min).
- **Aspirer** soigneusement le traceur puis rincer deux fois avec 2 mL de tampon de lavage. Procéder comme plus haut.
- **Mesurer la radioactivité** des tubes.

## 10. CALCUL DES RESULTATS

Calculer la moyenne des coups par minute pour chaque groupe de tubes après avoir soustrait la valeur du bruit de fond. Calculer la moyenne des coups par minute des étalons et des échantillons en pourcentage par rapport à l'activité totale:

$$B/T\% = \frac{\text{moyenne des coups par minute des étalons ou des échantillons}}{\text{moyenne des coups par minute de l'activité totale}} \times 100$$

Reporter sur du papier bilogarithmique le pourcentage moyen calculé pour chaque étalon sur l'axe des ordonnées (y) en fonction de la concentration d'IgG anti-hTg exprimée en UI/mL sur l'axe des abscisses (x). La Fig. 1 présente un exemple de la courbe d'étalonnage ainsi obtenue. Lire la concentration d'IgG anti-hTg de chaque échantillon exprimée en UI/mL directement de la courbe d'étalonnage. Si l'échantillon a été dilué au-delà de 1/51, la concentration d'anticorps obtenue doit être multipliée par le facteur de dilution au-delà de 1/51 en tenant compte du fait que les étalons sont déjà dilués au 1/51.

### Exemple de calcul

Les valeurs suivantes ne constituent qu'un exemple et ne doivent pas être employées à la place des données obtenues par l'utilisateur.

Description	cpm	B/T x 100
Activité totale	78.581	–
Etalon zéro/diluant pour échantillons	85	–
100 UI/mL	1.313	1,6
200 UI/mL	2.663	3,3
500 UI/mL	6.445	8,2
1500 UI/mL	19.955	25,3
6500 UI/mL	40.869	52,0
Echantillon	2.977	3,7

En effectuant l'interpolation de la courbe d'étalonnage, l'échantillon contient 230 UI/mL d'IgG anti-hTg.

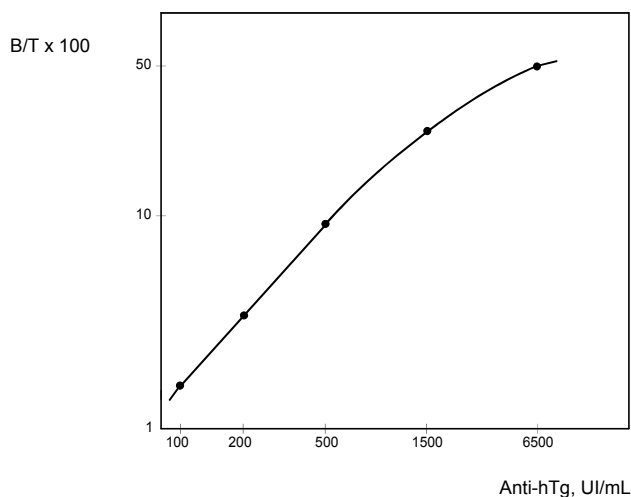


Fig. 1

## Interprétation des résultats

Le premier point étalon (100 UI/mL) représente la valeur seuil du système.

Les échantillons ayant une valeur égale ou supérieure à la valeur seuil sont considérés comme étant positifs vis-à-vis des IgG anti-hTg. Les échantillons ayant une valeur inférieure à la valeur seuil sont considérés comme étant négatifs.

*Cependant, nous suggérons de considérer comme douteux les échantillons dont la valeur d'IgG anti-hTg se situe dans  $\pm 20\%$  de la valeur seuil.*

*Chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.*

## 11. VALEURS DE REFERENCE

211 sujets ont été étudiés lors de l'investigation clinique. Parmi cette population, les sujets ont été classés négatifs, positifs et douteux par un test de référence.

96% des sujets classés comme négatifs avec la trousse DiaSorin présentent des valeurs d'IgG anti-hTg inférieures à 100 UI/mL et 100% des sujets classés positifs présentent des valeurs d'IgG anti-hTg supérieures à 100 UI/mL.

Toutefois, les valeurs reportées ci-dessus ne sont données qu'à titre indicatif; chaque laboratoire doit établir ses propres intervalles des valeurs de référence.

## 12. CARACTERISTIQUES DU DOSAGE

### 12.1. Spécificité analytique

La spécificité analytique est définie comme la capacité du test à détecter exactement l'analyte en présence de facteurs pouvant interférer dans la matrice de l'échantillon (par exemple anticoagulants, hémolyse, effets de traitement de l'échantillon) ou d'autres analytes pouvant provoquer des réactions croisées.

**Interférences.** Des études contrôlées sur des facteurs potentiellement interférents ont démontré que les caractéristiques du test ne sont pas modifiées par des anticoagulants (citrate, EDTA, héparine), par une légère hémolyse (jusqu'à 20 mg/dL d'hémoglobine), une lipémie (jusqu'à 10000 mg/dL de triglycérides), une bilirubinémie (jusqu'à 50 mg/dL de bilirubine) ou une congélation des échantillons.

**Réactions croisées.** L'emploi d'hTg hautement purifiée pour le revêtement des tubes réduit la possibilité d'interférences dues aux protéines non spécifiques. Aucune réaction croisée due à la présence d'auto-anticorps anti-TPO jusqu'à un niveau de 1000 U/mL n'a été observée.

### 12.2. Sensibilité analytique

La sensibilité analytique peut être exprimée aussi comme la limite de détection, c'est-à-dire la quantité d'analyte minimum que le test peut détecter. La limite de détection est de 6 UI/mL avec des limites de confiance à 95%, calculée comme étant la concentration apparente d'analyte qui peut être différenciée de l'étalon zéro (diluant pour échantillons), c'est-à-dire deux écarts type au-dessus de zéro.

### 12.3. Fidélité

Plusieurs pools de référence à différentes concentrations d'analyte ont été testés pour déterminer la répétabilité et la reproductibilité du dosage (c'est-à-dire, la variabilité intra-essai et inter-essais).

Répétabilité	A	B	C
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (UI/mL)	115	951	2924
Ecart type	3,3	42,7	105,0
% de coefficient de variation	2,9	4,4	3,6

Reproductibilité	A	D	E
Nombre de déterminations	10	10	10
Moyenne (UI/mL)	119	793	2361
Ecart type	13,9	53,0	177,0
% de coefficient de variation	11,6	6,7	7,5

#### 12.4. Justesse

La justesse du dosage a été vérifiée à l'aide du test de dilution.

**Test de dilution.** Le test de dilution a été réalisé sur deux sérums de concentration élevée en IgG anti-hTg dilués en série à l'aide du diluant pour échantillons.

Dilution	Concentration attendue, UI/mL	Concentration mesurée, UI/mL	% Récupération
pur	–	3089,00	–
1/2	1544,50	1640,00	106,2
1/4	772,30	776,70	100,6
1/8	386,10	381,80	98,9
1/16	193,10	204,50	105,9
1/32	96,50	107,60	111,5
pur	–	2457,00	–
1/2	1228,50	1246,50	101,5
1/4	614,25	609,40	99,2
1/8	307,13	321,80	104,8
1/16	153,56	157,50	102,6

#### 12.5. Effet de saturation à doses élevées

Dans une méthode *sandwich* comportant deux incubations, lorsque la concentration en anticorps est très élevée, on peut observer des concentrations apparentes d'anticorps inférieures aux valeurs réelles par effet de la saturation. Un système optimisé permet pourtant d'éliminer des résultats faussement sous-estimés conduisant à une interprétation erronée (comme il peut arriver dans les dosages *sandwich* avec une seule incubation).

On a dosé des concentrations d'auto-anticorps anti-hTg jusqu'à 100 mille UI/mL et on a observé que ces concentrations génèrent un signal analytique qui est toujours au-dessus de celui obtenu pour le point étalon le plus concentré (courbe à saturation). Pour une quantification correcte, les échantillons contenant des concentrations d'auto-anticorps anti-hTg supérieures à celle du point étalon le plus concentré doivent être dilués avec le diluant pour échantillons et dosés de nouveau. Les résultats devront alors être multipliés par le facteur de dilution au-delà de 1/51 pour obtenir les valeurs de concentration des échantillons purs.

#### 13. LIMITES DU DOSAGE

L'emploi du dosage radio-immunologique a réduit les résultats faux positifs de manière drastique. Cependant, le diagnostic ne doit pas être établi d'après le résultat d'un seul dosage, mais il faut prendre en considération les investigations cliniques, les autres procédures diagnostiques et l'avis d'un médecin.

La contamination bactérienne des échantillons ou leurs cycles répétés de congélation/ décongélation peuvent modifier les résultats du dosage.

Afin d'obtenir des résultats fiables, il faut suivre strictement le mode opératoire et effectuer les manipulations de façon appropriée. En particulier, la précision et le soin apportés durant les phases de reconstitution et de distribution des réactifs ainsi que d'aspiration et de lavage sont indispensables à la fiabilité du test.

Des résultats qui ne sont pas reproductibles sont dus principalement à des erreurs de manipulation comme par exemple:

- échange de bouchons entre les flacons
- utilisation du même embout pour prélever dans différents flacons ou distribuer les différents échantillons
- flacons restés trop longtemps ouverts
- exposition des réactifs ou des échantillons à une température élevée ou à de fortes sources de contamination bactérienne
- aspiration du mélange d'incubation et lavage des tubes inadéquats
- contamination du bord des tubes avec le traceur ou avec les échantillons
- oscillations accidentelles ou mauvais entretien du compteur gamma
- mélange de réactifs provenant de lots différents.

### SCHÉMA DU DOSAGE

- 1 - PRÉPARER LES RÉACTIFS. DILUER LES ÉCHANTILLONS AU 1/51.
- 2 - IDENTIFIER AU MOYEN D'UN REPÈRE LES TUBES REVÊTUS, EN DOUBLETS.
- 3 - DISTRIBUER LES RÉACTIFS EN FONCTION DU SCHÉMA SUIVANT PUIS AGITER LE MÉLANGE D'INCUBATION:

TUBES	T	ÉTALONS 0-5	ÉCHANTILLONS DILUÉS
RÉACTIFS			
ÉTALONS	—	50 µL	—
ÉCHANTILLONS DILUÉS	—	—	50 µL
TAMPON D'INCUBATION	—	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBER PENDANT 2 HEURES A TEMPÉRATURE AMBIANTE EN AGITATION.
- 5 - ASPIRER LE MÉLANGE D'INCUBATION, PUIS RINCER 2 FOIS AVEC 2 mL DE TAMPON DE LAVAGE.
- 6 - DISTRIBUER 500 µL DE TRACEUR DANS TOUS LES TUBES.
- 7 - INCUBER PENDANT 2 HEURES A TEMPÉRATURE AMBIANTE EN AGITATION.
- 8 - ASPIRER LE MÉLANGE D'INCUBATION ET RINCER 2 FOIS AVEC 2 mL DE TAMPON DE LAVAGE.
- 9- MESURER LA RADIOACTIVITÉ DES TUBES.



## Anti-hTg IgG IRMA

### Methode zur quantitativen immunradiometrischen Bestimmung der gegen das Human-Thyreoglobulin gerichteten Autoantikörper (Anti-hTg IgG) in Humanserum oder -plasma

Nur für In-vitro-Diagnostik

#### 1. EINLEITUNG

Die autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen umfassen ein breites Spektrum an Pathologien, die von der Hypothyreose (Hashimoto-Thyreoiditis) zur Hyperthyreose (Morbus Basedow) und zu den subklinischen Erkrankungen asymptomatischer euthyreoter oder hypothyreoter Patienten von biochemischer Sicht aus reichen. Die Verbindung zwischen diesen Extremfällen ist durch das Vorhandensein zirkulierender Autoantikörper gegeben, die gegen Schilddrüsen-Antigene gerichtet sind.

Bei der Immunthyreoiditis sind drei unterschiedliche Antigen-Antikörper-Systeme beschrieben worden, die im normalen Schilddrüsengewebe allgemein vorhanden sind und bei denen hTg, ein kolloidales Antigen und ein mikrosomales Antigen (Schilddrüsenperoxydase) involviert sind.

Gegen hTg gerichtete Autoantikörper sind Immunglobuline, die hauptsächlich der IgG- Klasse angehören. Ihre Bestimmung ist von großer klinischer Bedeutung für die Diagnose der autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen, wie der Morbus Basedow, die Hashimoto-Thyreoiditis und das primäre Myxödem.

Es besteht kein Zusammenhang zwischen dem Anti-hTg IgG-Spiegel und den Konzentrationen von T<sub>3</sub> oder T<sub>4</sub>; diese Antikörper sind sowohl bei Euthyreose als auch bei Hypo- oder Hyperthyreose nachweisbar.

Die autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen treten häufiger bei Frauen auf, bei denen der Autoantikörperspiegel mit zunehmendem Alter ansteigt, von ca. 10% bei Zwanzigjährigen bis zu 30% bei Frauen, die älter als sechzig sind. Diese Antikörperspiegel können zu chronischer Thyreoiditis und folglich zu Hypothyreose führen.

Beim primären Myxödem können signifikante Autoantikörperspiegel festgestellt werden, die für die Endstadien bei chronischer atrophischer autoimmuner Thyreoiditis kennzeichnend sind. Wenn bei jüngeren Patienten Struma und ein erhöhter Autoantikörperspiegel festgestellt wird, ist dies meist bezeichnend für die Hashimoto-Thyreoiditis, bei der die progressive Reduzierung der Schilddrüsenfunktion und folglich Hypothyreose auftritt.

Beim Morbus Basedow ist die toxische Struma mit der chronischen Thyreoiditis bei hohem Autoantikörperspiegel assoziiert.

In allen Fällen ist die Überwachung der Autoantikörperspiegel zur Therapieabstimmung und zur Erkennung des für die Verwandten des Erkrankten bestehenden Risikos des Auftretens einer Autoimmunkrankheit erforderlich.

#### 2. TESTPRINZIP

Der Test beruht auf der immunradiometrischen Technik (IRMA). An die Röhrcheninnenwand gebundenes hTg reagiert im ersten Reaktionsschritt mit dem in den Proben oder Kalibratoren vorhandenen Anti-hTg IgG. Im zweiten Schritt wird das mit <sup>125</sup>J markierte Protein A (<sup>125</sup>J-Tracer) an das Fc-Fragment des Antigen-Antikörper-Komplexes in fester Phase gebunden. Nach den zwei Inkubationen ist die Menge des gebundenen Proteins A proportional zur Konzentration des in den Proben oder Kalibratoren vorhandenen Anti-hTg IgG. Am Ende jeder Inkubation wird das ungebundene Material durch Absaugen und Waschen entfernt. Als Trennmethode wird die Coated-Tube-Technik verwendet, bei der das hTg an der Röhrcheninnenfläche fixiert ist.

Zur Bestimmung der gegen hTg gerichteten Antikörper wird das Protein A als Tracer verwendet. Es handelt sich dabei um ein Protein der Zellwand der Bakterie *Staphylococcus aureus*, das sich an das Fc-Fragment der IgG-Moleküle bindet.

#### 3. LIEFERUMFANG DES TESTS

Beschichtete Röhrchen	100
<sup>125</sup> J-Tracer	1 Fläschchen
Anti-hTg-Kalibratoren	6 Fläschchen
Kontrollserum	1 Fläschchen
Probenverdünnungslösung	2 Fläschchen
Inkubationspuffer	1 Fläschchen
Waschpuffer	2 Fläschchen
Anzahl der Bestimmungen	100

**LAGERUNG:** Die Testpackung bei 2-8°C lagern! Nicht einfrieren. Nach dem Öffnen sind alle Reagenzien des Kits bei entsprechender Lagerung bis zum Verfalldatum des Kits stabil. Der Kit wurde für die Durchführung von 4 analytischen Testserien entworfen, wenn er tagsüber bei Raumtemperatur verwendet und nachtsüber bei 2-8°C aufbewahrt wird.

*Die Reagenzien sind nicht nach dem Verfalldatum zu benutzen. Das Verfalldatum des Kits befindet sich auf der Verpackung und ist identisch mit dem Verfalldatum des Tracers. Die Verfalldaten der einzelnen Reagenzien sind jeweils auf den Flaschenetiketten angegeben.*

*Die Reagenzien unter Vermeidung von Schaum auflösen.*

*Nie unterschiedliche Reagenzienchargen miteinander mischen!*

### **3.1. Beschichtete Röhrchen**

Die Innenfläche jedes Röhrchens ist mit hochreinem biotinyliertem hTg beschichtet.

*Vor Gebrauch die Röhrchen in der ungeöffneten Dose auf Raumtemperatur bringen, um die Bildung von Kondenswasser auf der Oberfläche zu vermeiden.*

*Nichtgebrauchte Röhrchen in der Dose lagern. Die Dose gut verschließen. Nie verschiedene Chargen beschichteter Röhrchen miteinander mischen.*

### **3.2. <sup>125</sup>J-Tracer (rot) (gebrauchsfertige Lösung)**

Das Fläschchen enthält 52 mL mit <sup>125</sup>J markiertes Protein A, Rinderserumalbumin, Phosphat-Zitrat-Puffer, Konservierungsmittel und einen inerten roten Farbstoff. Die Radioaktivität beträgt max. 296 kBq (8 µCi) am Tag der Kalibration.

### **3.3. Anti-Thyreoglobulin-Kalibratoren (gebrauchsfertige Lösungen)**

Jedes Fläschchen enthält 0,5 mL vorverdünntes Humanserum, das Anti-hTg IgG enthält, Kalbserum, Rinderserumalbumin, PBS-Puffer und Konservierungsmittel. Die Konzentrationen der Kalibratoren sind: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 IE/mL. Die Kalibratoren des Kits sind nach dem internationalen Standard MRC 65/93 kalibriert. *Die Kalibratoren des Kits sind mit den untersuchten Proben umschaltbar, wenn sie mit den Reagenzien und der Testdurchführung dieses In-vitro diagnostischen Tests verwendet werden, gemäß den Anweisungen des Herstellers.*

*Da die Kalibratoren im Verhältnis 1:51 vorverdünnt wurden und die Werte entsprechend der Verdünnung vorliegen, können die IE/mL-Werte der unbekanntenen Proben direkt durch Interpolation von der Kalibrationskurve bestimmt werden. Ein Multiplikationsfaktor ist nur notwendig, wenn eine Probenverdünnung getestet wurde, die größer als eine Verdünnung von 1:51 ist.*

### **3.4. Kontrollserum (lyophilisiert)**

Das Fläschchen enthält vorverdünntes Humanserum, gegen hTg gerichtete Antikörper, Kalbserum, Rinderserumalbumin, PBS-Puffer und Konservierungsmittel. Der Konzentrationsbereich jeder Kontrolle ist auf dem Analysenzertifikat angegeben; er gibt die Grenzen an, die von DiaSorin für Kontrollwerte festgelegt wurden, die in zuverlässigen Testdurchgängen erhalten werden können.

Den Inhalt des Fläschchens in 1 mL Aqua dest. auflösen. Die so erhaltene Lösung ist bei 2-8°C bis zum Verfalldatum des Kits haltbar. Das Kontrollserum *darf nicht weiter verdünnt werden*. Den Wert von der Kalibrationskurve direkt ablesen.

### **3.5. Probenverdünnungslösung (gebrauchsfertige Lösung)**

Jedes Fläschchen enthält 50 mL PBS-Puffer, Kalbserum, Rinderserumalbumin und Konservierungsmittel.

*Das Reagenz ist sowohl für den AB-TPOK-3 Kit, als auch für den AB-HTGK-3 Kit anwendbar.*

### **3.6. Inkubationspuffer (blau) (gebrauchsfertige Lösung)**

Das Fläschchen enthält 52 mL TRIS-Puffer, Rinderserumalbumin, Waschmittel, Konservierungsmittel und einen inerten blauen Farbstoff.

### **3.7. Waschpuffer (10x Lösung)**

Jedes Fläschchen enthält 50 mL 0,5%iges Triton X-100-Konzentrat und Kochsalzlösung. Den ganzen Inhalt jedes Fläschchens bis zur 500-mL-Marke mit deionisiertem Wasser auffüllen. Die so erhaltenen Lösungen sind bei 2-8°C bis zum Verfalldatum des Kits haltbar. Diese Lösung wird zum Waschen der Röhrchen verwendet.

## **4. ERFORDERLICHE GERÄTE UND MATERIALIEN (NICHT IM KIT ENTHALTEN)**

- Aqua dest. und deionisiertes Wasser.
- Glasbehälter.
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch.
- Mikropipetten mit Einmalspitzen (10, 50, 500, 1000 µL) (10, 50 µL: Richtigkeit ± 3%, Präzision 2%; 500, 1000 µL: Richtigkeit ± 2%, Präzision 1%).
- Röhrchen-Ständer.
- Vortex-Mischer.
- Vibrationsschüttler (Mischgeschwindigkeit: 300-350 Upm).
- Wascheinheit zum Pipettieren und Absaugen des Waschpuffers, die 2-3 mL pro Waschzyklus während zwei Waschzyklen pipettieren kann.
- Gammacounter um das <sup>125</sup>J-Jod zu zählen (Anlegen der Counter-Öffnung: 15-80 keV - Counter-Leistungsfähigkeit: 70% - Zählungszeit: 1 Min.). Wenn die Counter-Leistungsfähigkeit kleiner als 60% ist, muss die Zählungszeit verlängert werden (2 Min.).

## 5. ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN

Es kann Humanserum oder -plasma verwendet werden. Die Antikoagulanten Zitrat, EDTA und Heparin wurden getestet und können in diesem Test benutzt werden. Blut aus der Vene entnehmen, koagulieren lassen und das Serum so schnell wie möglich vom Koagulat trennen. Die Proben, die Teilchen in Suspension aufweisen, trüb oder lipämisch sind, oder Erythrozytenreste aufweisen, durch Filtern oder Zentrifugieren klären. Weder stark hämolytische oder lipämische Proben, noch Proben mit Teilchen in Suspension oder eindeutiger Mikrobenkontamination verwenden! Werden die Bestimmungen innerhalb von 24 Stunden nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2-8°C aufbewahrt werden; andernfalls portioniert tiefgefrieren (-20°C oder kälter). Sind die Proben aufgetaut worden, vor der Bestimmung vorsichtig schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

### Probenverdünnung

Die zu bestimmenden Proben mit der Probenverdünnungslösung (3.5) vor Gebrauch im Verhältnis 1:51 verdünnen (z.B. 10 µL Probe + 500 µL Probenverdünnungslösung) und im Vortex-Mischer mischen.

Werden hohe Konzentrationen von Anti-hTg IgG erwartet, mit Probenverdünnungslösung noch stärker verdünnen. *Die Kalibratoren und das Kontrollserum sind gebrauchsfertig und müssen nicht verdünnt werden.*

## 6. TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien vor Gebrauch auf Raumtemperatur (20-25°C) bringen. Mindestens Doppelbestimmungen durchführen. Die Bestimmung der Kalibratoren ist für jede Proben-Serie durchzuführen. Kalibratoren und Proben unter den gleichen Bedingungen testen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerungen zwischen den einzelnen Versuchsschritten durchführen.

Für jede Pipettierung der Kalibratoren und der Proben saubere Einmalspitzen benutzen.

- Reagenzien *auf den Boden der beschichteten Röhrchen* pipettieren. Der Testverlauf erfolgt nach folgendem Schema:

Reagenzien \ Röhrchen	Kalibratoren 0-5	Verdünnte Proben
Kalibratoren	50 µL	–
Verdünnte Proben	–	50 µL
Inkubationspuffer	500 µL	500 µL

- Röhrcheninhalt **mischen** und **2 Stunden bei Raumtemperatur** auf dem Schüttler (300-350 Upm) **inkubieren**.
- Inkubationsmischung sorgfältig **absaugen** und zweimal mit 2 mL Waschpuffer **waschen**.  
*Es ist zu überprüfen, ob die Flüssigkeit vollständig eliminiert ist, indem man sich versichert, dass die Absaug-Pipettenspitze den Boden der beschichteten Röhrchen berührt. Das Vorhandensein von Tröpfchen, die an die Wände der beschichteten Röhrchen heften, kann schwer reproduzierbare oder unglaubliche Ergebnisse verursachen. Kein Farbstoff soll sichtbar sein.*
- **500 µL Tracer** in alle Röhrchen **pipettieren**. Je 500 µL Tracer zur Bestimmung der Totalaktivität in zwei unbeschichtete Röhrchen geben und bis zur Zählung stehen lassen.
- **2 Stunden bei Raumtemperatur** auf dem Schüttler (300-350 Upm) **inkubieren**.
- Tracer sorgfältig **absaugen** und zweimal mit 2 mL Waschpuffer **waschen**. Wie oben verfahren.
- Die **Radioaktivität** der Röhrchen **messen**.

## 7. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Die mittlere Nettozählrate von Proben und Kalibratoren ausrechnen. Den B/T%-Quotienten nach folgender Formel berechnen:

$$B/T\% = \frac{\text{mittlere Zählrate von Proben oder Kalibratoren}}{\text{mittlere Zählrate der Totalaktivität}} \times 100$$

Auf logarithmischem Papier die mittlere Prozentwerte jedes Kalibrators auf der Ordinate (y-Achse) in Funktion zur Anti-hTg IgG-Konzentration ausgedrückt in IE/mL auf der Abszisse (x-Achse) auftragen. Durch Verbinden der Punkte wird eine Kalibrationskurve erstellt (Abb. 1). Die Konzentrationen von Anti-hTg IgG von jeder Probe, ausgedrückt in IE/mL, direkt von der Kalibrationskurve ablesen. Wurde die Probe über den Anfangsfaktor 1:51 verdünnt, so muss die Anti-hTg IgG-Konzentration mit dem richtigen Verdünnungsfaktor multipliziert werden, indem man sich gegenwärtig hält, dass die Kalibratoren schon zu 1:51 vorverdünnt sind.

### Berechnungsbeispiel

Nachfolgende Daten gelten lediglich als Beispiel und dürfen nicht zur Ermittlung der tatsächlichen Ergebnisse benutzt werden.

Bezeichnung	cpm	B/T x 100
Totalaktivität	78.581	–
Nullkalibrator/Probenverdünnungslösung	85	–
100 IE/mL	1.313	1,6
200 IE/mL	2.663	3,3
500 IE/mL	6.445	8,2
1500 IE/mL	19.955	25,3
6500 IE/mL	40.869	52,0
Probe	2.977	3,7

Durch Ablesen von der Kalibrationskurve wird für die Probe einen Anti-hTg IgG-Wert von 230 IE/mL gefunden.

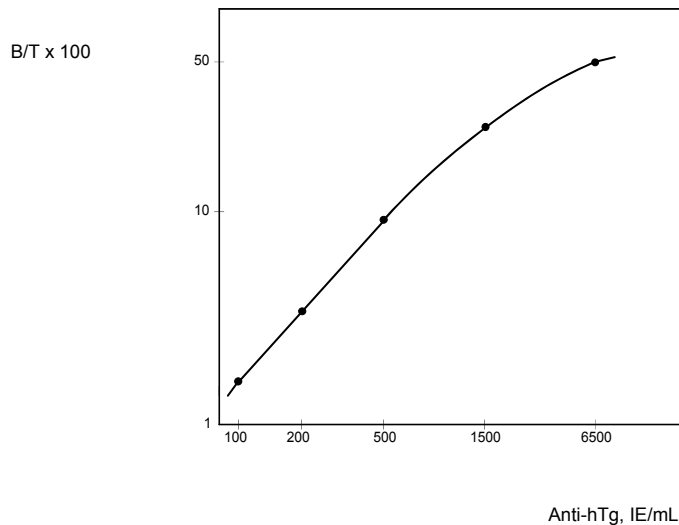


Abb. 1

### Interpretation der Ergebnisse

Der erste Kalibrator (100 IE/mL) stellt den Grenzwert des Systems dar.

Proben, deren Wert größer oder gleich dem Grenzwert ist, werden als positiv bewertet. Proben, deren Wert kleiner als der Grenzwert ist, werden als negativ bewertet. *Proben, deren Anti-hTg IgG-Wert innerhalb von  $\pm 20\%$  des Grenzwerts liegt, sind anzuzweifeln.*

*Es wird jedem Labor empfohlen, eigene Referenzbereiche zu bestimmen.*

### 8. ERWARTETE WERTE

Während des klinischen Versuchs wurden 211 Personen untersucht. In dieser Versuchsgruppe waren die Personen als negativ, positiv und zweifelhaft mit einem Bezugstest betrachtet.

Bei 96% der untersuchten, negativen Personen wurden Anti-hTg IgG-Werte unter 100 IE/mL mit DiaSorin Kit festgestellt. Bei 100% der untersuchten, positiven Personen wurden Anti-hTg IgG-Werte über 100 IE/mL mit DiaSorin Kit festgestellt.

Diese Werte sind lediglich als Anhaltswerte zu verstehen: Es wird jedem Labor empfohlen, eigene Referenzbereiche zu bestimmen.

## 9. TESTMERKMALE

### 9.1. Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität wird definiert als die Kapazität des Tests, den Analyten genau zu bestimmen bei Vorhandensein von potentiellen Interferenz-Faktoren in der Proben-Matrix (z.B. Antikoagulanten, Hämolyse, Effekte der Proben-Behandlung), oder Kreuzreaktionen mit potentiell interferierenden Analyten.

**Interferenzen.** Kontrollstudien über potentiell interferierende Faktoren haben gezeigt, dass die Leistungen des Tests nicht durch Antikoagulanten (Zitrat, EDTA, Heparin), leichte Hämolyse (bis 20 mg/dL Hämoglobin), Lipämie (bis 10000 mg/dL Triglyzeride), Bilirubinämie (bis 50 mg/dL Bilirubin).

**Kreuzreaktionen.** Durch die Verwendung von hochreinem hTg zur Röhrchenbeschichtung wird die Möglichkeit der Interferenz durch nichtspezifische Proteine reduziert. Kreuzreaktionen durch Autoantikörper, die gegen TPO gerichtet sind, bis zu einer Konzentration von 1000 E/mL wurden nicht beobachtet.

### 9.2. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität kann auch als Nachweisgrenze ausgedrückt werden, d.h. die minimale Quantität des Analyten, die durch den Test bestimmt werden kann. Die Nachweisgrenze ist 6 IE/mL bei einer Konfidenz-Grenze von 95%. Sie wurde als die scheinbare Analyt-Konzentration berechnet, die man vom Nullkalibrator (Probenverdünnungs- lösung) unterscheiden kann, d.h. zwei Standardabweichungen über dem Nullkalibrator.

### 9.3. Präzision

Zur Ermittlung der Wiederholpräzision und der Vergleichpräzision des Tests (d.h. Intra- und Inter-Assay) wurden verschiedene Probenpools unterschiedlicher Analyt-Konzentrationen untersucht.

Wiederholpräzision	A	B	C
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (IE/mL)	115	951	2924
Standardabweichung	3,3	42,7	105,0
Variationskoeffizient (%)	2,9	4,4	3,6

Vergleichpräzision	A	D	E
Anzahl der Bestimmungen	10	10	10
Mittelwert (IE/mL)	119	793	2361
Standardabweichung	13,9	53,0	177,0
Variationskoeffizient (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Richtigkeit

Die Richtigkeit der Bestimmung wurde durch den Verdünnungstest kontrolliert.

**Verdünnungstest.** Es wurden zwei Proben mit hohen Anti-hTg IgG-Konzentrationen nach serieller Verdünnung mit der Probenverdünnungslösung getestet.

Verdünnung	Erwartete Konzentration, IE/mL	Erhaltene Konzentration, IE/mL	% Wiederfindung
leer	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
leer	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,40	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Sättigungseffekt bei hohen Konzentrationen

Wenn Proben mit extrem hohen Antikörper-Konzentrationen mit einer *Sandwich*-Methode mit zwei Inkubationen getestet werden, ist es möglich, durch den Sättigungseffekt scheinbare Antikörper-Niveaus zu erhalten, die unterhalb der wirklichen Werte liegen. Ein gut optimiertes System schließt jedoch stark unterschätzte Werte aus (wie es bei den *Sandwich*-Methoden mit einer Inkubation passieren kann).

Es wurden Anti-hTg IgG-Konzentrationen bis zu 100.000 IE/mL bestimmt und es wurde beobachtet, dass diese Konzentrationen ein analytisches Signal hervorbringen, das immer höher als der konzentrierteste Kalibrator (Sättigungskurve) ist. Für eine korrekte Quantifizierung, müssen die Proben, die höhere Anti-hTg IgG-Niveaus als das des konzentriertesten Kalibrators aufweisen, mit der Probenverdünnungslösung verdünnt und neu dosiert werden. Die Ergebnisse müssen dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, der größer als 1:51 ist, um die Anti-hTg IgG-Niveaus der unverdünnten Proben zu erhalten.

### 10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Durch die Verwendung von Radioimmunassays sind falsch positive Werte selten geworden. Wie bei jedem analytischen Verfahren darf die Diagnose eines Patienten jedoch nicht auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden, sondern muss zusammen mit anderen klinischen Untersuchungen, Diagnoseverfahren und nach dem Urteil des Arztes erfolgen.

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholte Tiefgefrieren- und Auftauen-Zyklen können die Ergebnisse der Bestimmung ändern.

Die einwandfreie Beherrschung der Arbeitstechnik und die strikte Einhaltung der Arbeitsanleitung sind Voraussetzung für die Erzielung zuverlässiger Ergebnisse. Auf präzise Herstellung und Verteilung der Reagenzien und gutes Pipettieren und gründliches Absaugen und Waschen ist zu achten.

Nicht wiederholbare Proben können folgende Ursachen haben:

- Vertauschen der Fläschchenverschlüsse.
- Verwendung derselben Pipettenspitze beim Pipettieren aus verschiedenen Reagenzfläschchen oder beim Pipettieren unterschiedlicher Proben.
- Aufbewahren der Reagenzien oder Proben bei hohen Temperaturen (> 25°C) und bakterielle Kontamination.
- Bakterielle Kontamination durch zu langes Offenlassen der Fläschchen.
- Unzureichendes Absaugen und Waschen der Röhren.
- Kontamination der Röhrenränder durch Tracer oder Proben.
- Schlechte Detektorstandardisierung und fehlerhafte Bedienung des Counters.
- Verwendung von Reagenzien aus verschiedenen Chargen.

### 11. WARNUNGEN

Die Testkomponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel. Weil Natriumazid explosives Bleioder Kupferazid in Rohrleitungen bilden kann, wird empfohlen, den Abfluss, nach dem Wegschütten von Substanzen, die Natriumazid enthalten, vollständig mit Wasser durchzuspülen (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.

R 31 – Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

S 28 – Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit vielem Wasser.

S 45 – Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

Alle für die Herstellung der Kit-Komponenten benutzten Serum- und Plasmaproben wurden analysiert und als nichtreaktiv für HBsAg, Anti-HCV und Anti-HIV-1/2 befunden. Da jedoch kein Prüfverfahren Keimfreiheit wirklich garantieren kann, sollten alle Präparate menschlicher Herkunft als potentiell infektiös angesehen und dementsprechend vorsichtig behandelt werden.

### 12. SICHERHEITSMASSNAHMEN

- Essen, Trinken, Rauchen und Schminken sind im Labor verboten.
- Lösungen dürfen nicht mit dem Mund pipettiert werden.
- Der direkte Kontakt mit potentiell infiziertem Material ist durch das Tragen von Laborkitteln, Schutzbrille und Einweghandschuhen zu vermeiden. Nach Beendigung des Tests sollten die Hände gründlich gewaschen werden.
- Verspritzen oder Bildung von Aerosol sind zu vermeiden. Verschüttete Reagenzien sollten mit 5%iger Natriumhypochlorit-Lösung entfernt werden. Dabei ist zu beachten, dass es sich hierbei um potentiell infektiöses Material handeln kann.
- Alle Proben, biologischen Reagenzien und für die Testdurchführung verwendeten Materialien müssen als potentiell infektiös angesehen werden. Die Beseitigung des Abfalls ist nach den Vorschriften der zuständigen Aufsichtsbehörde sowie nach den Anweisungen des verantwortlichen Amtes durchzuführen. Abfall sollte verbrannt werden. Flüssigkeiten müssen mit Natriumhypochlorit dekontaminiert werden. Dabei sollte das Natriumhypochlorit in einer Konzentration von 5% im Endgemisch vorliegen und mindestens 30 Minuten auf die zu beseitigenden Materialien einwirken. Alle Materialien, die wieder verwendet werden sollen, müssen mit einer übertriebenen (*overkill*) Methode (USP 24, 2000, S. 2143) autoklaviert werden. Im Allgemeinen wird eine Stunde bei 121°C als angebrachte Sterilisationszeit angesehen, dennoch wird jedem Benutzer empfohlen, die Wirksamkeit des Dekontaminationszyklus anfangs zu überprüfen und routinemäßig biologische Indikatoren einzusetzen.

### 13. GRUNDREGELN DES STRAHLENSCHUTZES

#### Reagenzien mit Jod-125

Dieses Kit enthält radioaktives Material mit höchstens 8,12 µCi (300 kBq) Jod-125. Bei der Lagerung, Handhabung und Entsorgung dieses Materials sind entsprechende Vorsichtsmaßnahmen und gute Laborpraktiken einzuhalten.

Für Ärzte bzw. Institutionen, die im Rahmen einer Generallizenz Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Erwerb, Besitz und Verwendung dieses radioaktiven Materials sind nur Ärzten, veterinärmedizinisch tätigen Tierärzten, klinischen Labors oder Krankenhäusern und nur für klinische In-vitro-Tests oder In-vitro-Labortests gestattet, bei denen kein interner oder externer Kontakt des Materials oder seiner Strahlung mit Menschen oder Tieren stattfindet. Entgegennahme, Erwerb, Besitz, Verwendung und Weitergabe des Materials unterliegen den Vorschriften und der Generallizenz der US Nuclear Regulatory Commission bzw. des Staates, mit dem diese Behörde ein Abkommen zur Ausübung ihrer Überwachungsfunktion abgeschlossen hat.

1. Die Lagerung des radioaktiven Materials ist auf einen speziell dafür bestimmten Bereich zu beschränken.
2. Der Zugang zu radioaktivem Material ist nur befugten Personen zu gestatten.
3. Radioaktives Material nicht mit dem Mund pipettieren.
4. Im vorgesehenen radioaktiven Arbeitsbereich nicht essen oder trinken.
5. Verschüttetes Material aufwischen und den Bereich anschließend mit alkalischem Reinigungsmittel oder radiologischer Dekontaminationslösung wischen. Alle benutzten Glasbehälter gründlichst mit Wasser spülen, bevor sie zusammen mit anderen Laborbehältern aus Glas ausgewaschen werden.

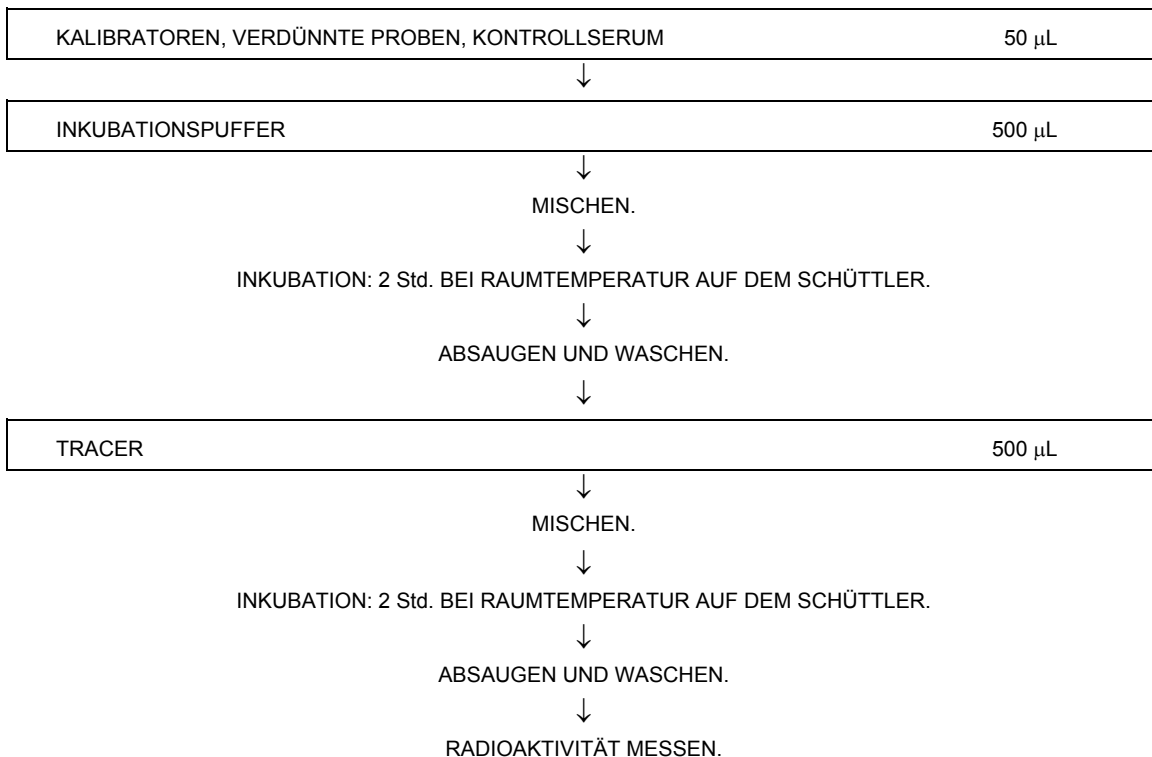
Für Ärzte oder Einrichtungen, die im Rahmen einer Sondergenehmigung Radioisotope erhalten, gilt Folgendes:

Entgegennahme, Gebrauch, Weitergabe und Entsorgung radioaktiven Materials unterliegen den Vorschriften und Bedingungen der jeweiligen Sondergenehmigung.

**WICHTIGER HINWEIS:** Die auf der Packungsbeilage angegebene Radioaktivität kann von der auf dem Etikett des Kartons und des Tracer-Fläschchens angegebenen etwas abweichen. Sowohl das Etikett des Kartons als auch das Etikett des Tracer-Fläschchens geben den tatsächlichen Wert der Radioaktivität am Kalibrationsdatum an, während die Packungsbeilage die theoretische Radioaktivität des Kits angibt.

#### AB-HTGK-3 PIPETTIERSHEMA

BITTE SORGFÄLTIG DIE GEBRAUCHSANLEITUNG BEACHTEN.



## KIT PARA LA DETERMINACIÓN INMUNORRADIOMÉTRICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA

### Procedimiento para el análisis cuantitativo de los autoanticuerpos anti-tiroglobulina humana (IgG anti-hTg) en muestras de suero o plasma humano

Sólo para uso in vitro

#### 1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes del tiroides comprenden un amplio espectro de patologías que abarcan desde el hipotiroidismo (tiroiditis de Hashimoto) al hipertiroidismo (enfermedad de Graves-Basedow), a las afecciones subclínicas en sujetos asintomáticos eutiroideos o hipotiroideos desde un punto de vista bioquímico. El enlace entre estos extremos está representado por la presencia de autoanticuerpos circulantes dirigidos contra antígenos tiroideos.

En la tiroiditis autoinmune han sido descritos tres sistemas antígeno-anticuerpo distintos – comúnmente presentes en el tejido del tiroides normal – que afectan respectivamente a hTg, un antígeno coloidal y uno microsomial (tiroides peroxidasa).

La detección de autoanticuerpos anti-hTg, fundamentalmente pertenecientes a la clase IgG (IgG anti-hTg), es de gran utilidad clínica en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes del tiroides como enfermedad de Graves-Basedow, tiroiditis de Hashimoto y mixedema primario.

El nivel de IgG anti-hTg no está relacionado con las concentraciones de T<sub>3</sub> o de T<sub>4</sub>; de hecho, estos anticuerpos se pueden encontrar en sujetos eutiroideos o bien hipo- o hipertiroideos.

Las enfermedades autoinmunes del tiroides son más frecuentes en las mujeres, en las que la presencia de autoanticuerpos aumenta con la edad, con una preponderancia de aproximadamente el 10% alrededor de los veinte años y hasta el 30% por encima de los sesenta. Estos niveles de anticuerpos pueden provocar tiroiditis crónica con el consiguiente hipotiroidismo.

En el mixedema primario se observan unos niveles significativos de autoanticuerpos característicos de las fases terminales de tiroiditis autoinmune crónica atrófica. En los pacientes más jóvenes la detección de bocio y de elevados niveles de autoanticuerpos indica generalmente tiroiditis de Hashimoto, que está caracterizada por una progresiva reducción de la funcionalidad tiroidea con el consiguiente hipotiroidismo.

En la enfermedad de Graves-Basedow, el bocio tóxico está asociado a la tiroiditis crónica, con presencia de elevados niveles de autoanticuerpos circulantes.

En todos los casos, el control de los niveles de autoanticuerpos es útil para el seguimiento de la terapia y para la identificación del riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune en los familiares de los sujetos enfermos.

#### 2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El método utilizado es de tipo inmunorradiométrico (IRMA). En la primera fase la IgG anti-hTg contenida en los calibradores o en las muestras se enlaza a la hTg adsorbida en fase sólida. En la segunda fase, la proteína A marcada con <sup>125</sup>I (trazador <sup>125</sup>I) añadida enlaza los complejos IgG-hTg en fase sólida. Después de las dos incubaciones, la cantidad de proteína A marcada enlazada a la fase sólida es proporcional a la concentración de IgG anti-hTg presente en los calibradores o en las muestras. Al final de cada incubación, el material que no ha enlazado se elimina con aspiración y lavado. El método adoptado para la separación libre/enlazado se basa en el empleo de los tubos recubiertos, en donde la hTg se fija a las paredes de los tubos.

La determinación de anticuerpos anti-hTg utiliza como trazador la proteína A, una proteína de la pared celular de la bacteria *Staphylococcus aureus* que tiene la capacidad de enlazarse al fragmento Fc de las moléculas de IgG.

#### 3. REACTIVOS SUMINISTRADOS EN EL KIT

Tubos recubiertos	100
Trazador <sup>125</sup> I	1 vial
Calibradores de anti-hTg	6 viales
Suero de control	1 vial
Diluyente de las muestras	2 viales
Tampón de incubación	1 vial
Tampón de lavado	2 viales
Número de ensayos	100

**MODO DE CONSERVACIÓN:** A su llegada conserve el kit a 2-8°C. No congele. Después de la apertura, los reactivos de este kit son estables hasta la fecha de caducidad del kit si se conservan de manera adecuada. El kit está garantizado para 4 sesiones analíticas si se utiliza a lo largo del día a temperatura ambiente y si se conserva durante la noche a 2-8°C.



No use los reactivos pasada la fecha de caducidad. La fecha de caducidad del kit está escrita en la etiqueta exterior y corresponde a la fecha de caducidad del trazador. La fecha de caducidad de cada componente está indicada en las etiquetas de los respectivos viales.

Al reconstituir el contenido de los viales, agite delicadamente para evitar la formación de espuma.

No mezcle los reactivos provenientes de lotes diferentes.

### 3.1. Tubos recubiertos

La superficie interior de cada tubo está recubierta con hTg biotinilada altamente purificada.

En el momento del uso, ponga los tubos recubiertos a temperatura ambiente antes de abrir el contenedor, para evitar condensaciones de humedad.

Los tubos no utilizados pueden ser conservados controlando que el contenedor esté bien cerrado. No mezcle lotes diferentes de tubos recubiertos.

### 3.2. Trazador $^{125}\text{I}$ (rojo): reactivo listo para el uso

El vial contiene 52 mL de proteína A marcada con  $^{125}\text{I}$ , albúmina sérica bovina, tampón fosfato-citrato, conservantes y un colorante rojo inactivo. La radioactividad máxima es de 296 kBq (8  $\mu\text{Ci}$ ) en la fecha de calibración.

### 3.3. Calibradores de anti-tiroglobulina: reactivo listo para el uso

Cada vial contiene 0,5 mL de suero humano prediluido que contiene IgG anti-hTg, suero de becerro, albúmina sérica bovina, tampón PBS y conservantes. Las concentraciones de los calibradores son las siguientes: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 UI/mL. Los calibradores del kit están calibrados contra el Estándar Internacional MRC 65/93. Los calibradores del kit son conmutables con las muestras en examen cuando se utilizan con los reactivos y con el procedimiento operativo de este test diagnóstico in vitro, según las recomendaciones del fabricante.

Dado que los calibradores han sido prediluidos 1:51 y se han determinado los respectivos valores, la concentración de las muestras en UI/mL se puede calcular directamente por interpolación de la curva de calibración. Es necesario introducir un factor de multiplicación sólo cuando la dilución de la muestra es superior a 1:51.

### 3.4. Suero de control: reactivo liofilizado

El vial contiene suero humano prediluido, anticuerpos anti-tiroglobulina, suero de becerro, albúmina sérica bovina, tampón PBS y conservantes. El rango de concentraciones de cada control aparece en el certificado de análisis, e indica los límites definidos por DiaSorin para los valores de control que se pueden obtener a partir de ensayos fiables.

Reconstituya el contenido del vial con 1 mL de agua destilada. La solución que resulta es estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad del kit. Se aconseja *no diluir más* el suero de control. Lea directamente el valor de la curva de calibración.

### 3.5. Diluyente de las muestras: reactivo listo para el uso

Cada vial contiene 50 mL de tampón PBS, suero de becerro, albúmina sérica bovina y conservantes.

El reactivo es común a los kit AB-TPOK-3 y AB-HTGK-3.

### 3.6. Tampón de incubación (azul): reactivo listo para el uso

El vial contiene 52 mL de solución de tampón TRIS, albúmina sérica bovina, detergentes, conservantes y un colorante azul inactivo.

### 3.7. Tampón de lavado: reactivo en solución (10x)

Cada vial contiene 50 mL de Triton X-100 al 0,5% y solución salina.

Ponga a volumen de 500 mL con agua desionizada el contenido completo de cada vial. La solución que resulta es estable a 2-8°C hasta la fecha de caducidad del kit. La solución se utiliza para el lavado de los tubos recubiertos.

## 4. MATERIALES E INSTRUMENTOS REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada y desionizada.
- Útiles de laboratorio de vidrio.
- Tubos de plástico desechables.
- Micropipetas con puntas desechables de 10, 50  $\mu\text{L}$  (veracidad  $\pm 3\%$ , precisión 2%) y 500, 1000  $\mu\text{L}$  (veracidad  $\pm 2\%$ , precisión 1%).
- Gradillas para tubos.
- Agitador Vórtex.
- Agitador rotante con velocidad de agitación de 300-350 rpm.
- Sistema para distribuir y aspirar el tampón de lavado, en condiciones de distribuir 2- 3 mL por ciclo de lavado durante dos ciclos de lavado.
- Contador gamma para contar el yodo  $^{125}\text{I}$  (establecimiento de la ventana del contador: 15-80 keV - eficiencia del contador: 70% - tiempo de cómputo: 1 min). Si la eficiencia del contador es inferior al 60%, el tiempo de cómputo debe ser prolongado a 2 min.

## 5. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo se puede efectuar en muestras de suero o plasma humano. Se pueden utilizar anticoagulantes como el citrato, el EDTA y la heparina. Recoja la sangre mediante punción venosa, déjela coagular y separe el suero del coágulo lo antes posible. Clarifique por filtración o centrifugación antes del ensayo las muestras que presenten material en suspensión, opalescencia, lipemia o residuos eritrocitarios. No use muestras fuertemente hemolizadas o lipémicas, ni muestras que presenten material suspendido o evidente contaminación microbiana. Si el ensayo se lleva a cabo dentro de las 24 horas sucesivas a la recogida, las muestras se pueden conservar a 2-8°C. En caso contrario, se deben subdividir en alícuotas congeladas a -20°C o a temperaturas inferiores. Si las muestras han sido descongeladas, agítelas con cuidado antes de realizar el ensayo. Evite repetidas congelaciones y descongelaciones.

### Dilución de las muestras

Las muestras deben diluirse 1:51 con el diluyente de las muestras (3.5) antes del ensayo. Distribuya 10 µL de muestra y 500 µL de diluyente de las muestras en los tubos de plástico y agite en el Vórtex. Si se prevén concentraciones elevadas de IgG anti-hTg, diluya más con el diluyente de las muestras. *Los calibradores y el suero de control están listos para su uso y no hay que diluirlos.*

## 6. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

Ponga los reactivos a temperatura ambiente (20-25°C) antes del ensayo. Prevea determinaciones por duplicado como mínimo. Se debe realizar la determinación de los calibradores para cada serie de muestras analizadas. El procedimiento operativo debe ser exactamente idéntico para los calibradores y para las muestras en examen. Realice todas las fases del ensayo en el orden previsto, sin interrupción.

Utilice puntas desechables nuevas para dispensar calibradores y muestras.

- Distribuya los reactivos *en el fondo de los tubos recubiertos*. Actúe según el siguiente esquema:

reactivos	tubos	Calibradores 0-5	Muestras diluidas
Calibradores		50 µL	-
Muestras diluidas		-	50 µL
Tampón de incubación		500 µL	500 µL

- **Agite** el contenido de los tubos e **incube durante 2 horas a temperatura ambiente** en agitación (300-350 rpm).
- **Aspire** cuidadosamente la mezcla de incubación y **lave** dos veces con 2 mL de tampón de lavado. *Verifique que el líquido sea eliminado completamente, controlando que la punta de la pipeta de aspiración toque el fondo de los tubos recubiertos. La presencia de gotas adherentes a las paredes de los tubos recubiertos puede provocar baja reproducibilidad o resultados no fiables. No debe quedar traza del colorante.*
- **Distribuya 500 µL de trazador** en todos los tubos. Prepare dos tubos no recubiertos para el cálculo de la actividad total, que contengan solamente 500 µL de trazador y déjelos separados hasta el momento de la medida de la radioactividad.
- **Incube durante 2 horas a temperatura ambiente** en agitación (300-350 rpm).
- **Aspire** cuidadosamente el trazador y **lave** dos veces con 2 mL de tampón de lavado. Actúe como antes.
- **Mida la radioactividad** de los tubos.

## 7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule la media de los cómputos para cada grupo de tubos después de haber abstraído el valor del fondo. Exprese la media de los cómputos de los calibradores y las muestras como porcentaje respecto a la actividad total:

$$B/T\% = \frac{\text{cómputo medio calibradores o muestras}}{\text{cómputo medio actividad total}} \times 100$$

Indique en un gráfico log-log el porcentaje medio calculado para cada calibrador en la ordenada (eje de las y) en función de la concentración de IgG anti-hTg expresada en UI/mL en la abscisa (eje de las x). De esta manera se obtiene una curva de calibración (Fig. 1). Lea directamente de la curva de calibración la concentración de IgG anti-hTg de cada muestra expresada en UI/mL. Si la muestra ha sido diluida por encima del factor inicial de 1:51, la concentración de anticuerpos encontrada debe ser multiplicada por el factor de dilución superior a 1:51, teniendo en cuenta que los calibradores ya están prediluidos 1:51.

### Ejemplo de cálculo

Los siguientes datos deben ser considerados sólo un ejemplo y no deben usarse en lugar de los datos obtenidos por el utilizador.

Descripción	cpm	B/T x 100
Actividad total	78.581	–
Calibrador cero/diluyente de las muestras	85	–
100 UI/mL	1.313	1,6
200 UI/mL	2.663	3,3
500 UI/mL	6.445	8,2
1500 UI/mL	19.955	25,3
6500 UI/mL	40.869	52,0
Muestra	2.977	3,7

Interpolando de la curva de calibración, la muestra resulta contener 230 UI/mL de IgG anti-hTg.

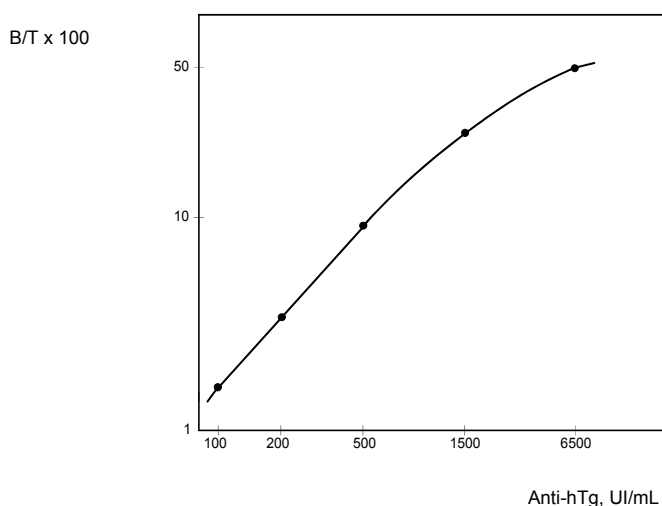


Fig. 1

### Interpretación de los resultados

El primer calibrador (100 UI/mL) representa el valor límite (de cut-off) del sistema. Se consideran positivas para la presencia de IgG anti-hTg las muestras con valor igual o superior al valor límite. Las muestras con valor inferior al valor límite se considerarán negativas.

*Sin embargo, se recomienda considerar dudosas las muestras con valores de IgG anti-hTg comprendidos entre  $\pm 20\%$  del valor límite.*

*Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.*

### 8. DATOS CLÍNICOS

Durante los estudios clínicos se tomaron en consideración 211 sujetos. En esta población, los sujetos fueron clasificados negativos, positivos y dudosos con un test de referencia.

Con el kit DiaSorin el 96% de los sujetos clasificados negativos presenta valores de IgG anti-hTg inferiores a 100 UI/mL y el 100% de los sujetos clasificados positivos presenta valores de IgG anti-hTg superiores a 100 UI/mL.

Sin embargo, los valores mostrados más arriba son sólo indicativos. Se recomienda a cada laboratorio que establezca sus propios intervalos de referencia.

### 9. PRESTACIONES METODOLÓGICAS DEL KIT

#### 9.1. Especificidad analítica

La especificidad analítica se define como la capacidad que tiene el test para detectar exactamente el analito ante la presencia de factores potencialmente interferentes en la matriz de la muestra (por ejemplo, anticoagulantes, hemólisis, efectos de tratamientos de la muestra) o de reacciones cruzadas con analitos potencialmente interferentes.

**Interferencias.** Estudios controlados sobre los factores potencialmente interferentes han demostrado que las prestaciones del test no están influenciadas por anticoagulantes (citrato, EDTA, heparina), hemólisis leve (hasta 20 mg/dL de hemoglobina), lipemia (hasta 10000 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (hasta 50 mg/dL de bilirrubina).

**Reacciones cruzadas.** El uso de hTg sumamente purificada para recubrir los tubos reduce la posibilidad de interferencias debidas a proteínas no específicas. No se han observado reacciones cruzadas debidas a la presencia de autoanticuerpos anti-TPO hasta una concentración de 1000 U/mL.

### 9.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se puede expresar también como el límite de detección, es decir la cantidad mínima de analito específico que el test puede detectar. El límite de detección es de 6 UI/mL al 95% de confianza. Ha sido calculado como la concentración aparente de analito distinguible del calibrador cero (diluyente de las muestras), es decir, dos desviaciones estándar por encima de cero.

### 9.3. Precisión

La repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo (es decir las variaciones intra-ensayo e inter-ensayo) han sido determinadas utilizando las muestras de referencia con diferentes concentraciones de analito.

Repetibilidad	A	B	C
Número de determinaciones	10	10	10
Media (UI/mL)	115	951	2924
Desviación estándar	3,3	42,7	105,0
Coefficiente de variación (%)	2,9	4,4	3,6

Reproducibilidad	A	D	E
Número de determinaciones	10	10	10
Media (UI/mL)	119	793	2361
Desviación estándar	13,9	53,0	177,0
Coefficiente de variación (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Veracidad

La veracidad del ensayo ha sido controlada mediante el test de dilución.

**Test de dilución.** Se han determinado diluciones en serie de dos sueros de concentración elevada de IgG anti-hTg realizadas en el diluyente de las muestras.

Dilución	Concentración esperada, UI/mL	Concentración medida, UI/mL	% Recuperación
no diluido	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
no diluido	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,40	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Efecto saturación con altas concentraciones

Cuando se ensayan muestras que contengan concentraciones de anticuerpos sumamente elevadas con un método *sandwich* con dos incubaciones, se pueden obtener unos niveles aparentes de anticuerpo inferiores al nivel real por efecto de la saturación. Sin embargo, un sistema bien optimizado excluye que se obtengan resultados subestimados (como se puede comprobar en los ensayos *sandwich* con una incubación).

Se han ensayado concentraciones de IgG anti-hTg hasta 100 mil UI/mL y se ha observado que estas concentraciones generan una señal analítica siempre superior al calibrador más concentrado (curva a saturación). Para cuantificar las muestras correctamente, las muestras que contienen unos niveles de IgG anti-hTg mayores que el del calibrador más concentrado deben ser diluidas con el diluyente de las muestras y analizadas de nuevo. Los resultados entonces deben ser multiplicados por el factor de dilución superior a 1:51 para obtener los niveles de IgG anti-hTg de las muestras no diluidas.

#### **10. LIMITACIONES DEL ENSAYO**

El uso del ensayo radioinmunológico ha reducido drásticamente los resultados falsos positivos. Sin embargo, el diagnóstico no se debe formular en base al resultado de un solo ensayo, sino que éste se debe validar con otras pruebas clínicas, procedimientos diagnósticos y con la opinión del médico.

La contaminación bacteriana o las repetidas congelaciones/descongelaciones de las muestras pueden modificar los resultados del test.

Para obtener resultados fiables, es necesario respetar estrictamente las instrucciones de utilización y poseer una adecuada técnica manual. En concreto, la precisión y el cuidado en las fases de reconstitución y distribución de los reactivos y de aspiración y lavado son indispensables para la fiabilidad del ensayo.

Resultados no reproducibles se deben principalmente a factores metodológicos, como por ejemplo:

- cambio de las tapas entre los viales
- uso de la misma punta para la recogida de diferentes viales o para dispensar diferentes muestras
- viales que se han dejado abiertos durante un largo período de tiempo
- exposición de los reactivos o de las muestras a calor intenso o a fuertes fuentes de contaminación bacteriana
- aspiración de la mezcla de incubación y lavado de los tubos inadecuados
- contaminación del borde de los tubos con el trazador o bien con las muestras
- oscilaciones casuales o mal mantenimiento del contador gamma
- intercambio de reactivos procedentes de diferentes lotes.

#### **11. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES**

Los componentes del kit contienen azida sódica como conservante. Ya que, la azida sódica puede formar azidas de plomo o de cobre explosivas en las tuberías, se recomienda dejar fluir agua en abundancia en los desagües después de la eliminación de soluciones que contengan azida sódica (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestión.

R 31 – En contacto con ácidos libera gases tóxicos.

S 28 – En caso de contacto con la piel, lávese inmediata y abundantemente con agua.

S 45 – En caso de accidente o malestar, acúdase inmediatamente al médico (si es posible, muéstresele la etiqueta).

Todas las unidades de suero o plasma utilizadas para la fabricación de los componentes de este kit se han analizado y se han determinado no reactivas para HBsAg, para anti-HCV y para anti-HIV-1/2. Sin embargo, visto que ningún método puede asegurar que los agentes patógenos estén ausentes, todo el material de origen humano se debería considerar potencialmente infeccioso y ser manipulado como tal.

#### **12. NORMAS DE SEGURIDAD**

- No coma, beba, fume o se maquille durante la ejecución del ensayo.
- No pipetee las soluciones con la boca.
- Evite el contacto directo con el material potencialmente infeccioso usando batas de laboratorio, gafas de protección y guantes desechables. Lávese cuidadosamente las manos al terminar el ensayo.
- Evite salpicaduras o formación de aerosoles. En caso de que esto sucediera, cada gota de reactivo se debe eliminar con una solución de hipoclorito sódico al 5% y el medio utilizado se deberá tratar como material residuo potencialmente infeccioso.
- Todas las muestras, los reactivos biológicos del kit y los materiales usados para efectuar el ensayo se deben considerar capaces de transmitir agentes infecciosos; por lo tanto, los residuos se deberán eliminar de acuerdo con las reglamentaciones de las agencias autorizadas que tengan jurisdicción sobre el laboratorio y con las normativas de cada país. El material desechable deberá ser incinerado; los residuos líquidos deberán ser descontaminados con una solución de hipoclorito sódico a una concentración final del 5% durante media hora como mínimo. Cualquier material que pueda ser reutilizado deberá ser tratado en autoclave con un tratamiento de exceso (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Generalmente se considera que una hora a 121°C es un tiempo de esterilización adecuado; sin embargo se recomienda a cada usuario que verifique la eficacia del ciclo de descontaminación mediante una validación inicial y el uso rutinario de indicadores biológicos.

### 13. REGLAS BÁSICAS DE SEGURIDAD CONTRA LAS RADIACIONES

#### Reactivos con contenido de azida sódica

Este equipo contiene material radiactivo que no supera de 8,12  $\mu\text{Ci}$  (300 kBq) de yodo-125. Para almacenar, manejar y desechar este material, deben adoptarse las precauciones necesarias y prácticas de laboratorio correctas.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia genérica:

Este material radiactivo sólo deben recibirlo, adquirirlo, poseerlo y utilizarlo médicos, veterinarios que practiquen la medicina veterinaria, laboratorios clínicos u hospitales, y sólo para pruebas in vitro clínicas o de laboratorio que no conlleven la administración interna o externa del material ni su radiación a seres humanos ni animales. Su recepción, adquisición, posesión, uso y transferencia se rigen por la normativa y la licencia genérica de la Comisión Reguladora Nuclear del estado en el que la Comisión haya llegado a un acuerdo para el ejercicio de su autoridad reguladora.

1. El almacenamiento del material radiactivo debe limitarse a un área destinada específicamente a tal efecto.
2. El acceso a materiales radiactivos debe estar limitado a personal autorizado únicamente.
3. No recoja material radiactivo con la pipeta usando la boca.
4. No coma ni beba dentro de las áreas destinadas a trabajos radiactivos.
5. Las áreas donde puedan producirse derrames deben enjugarse y después lavarse con un detergente alcalino o una solución decontaminante radiológica. Todo recipiente de vidrio utilizado debe enjugarse completamente con agua antes de lavarse con otros recipientes de laboratorio.

Para facultativos o instituciones que reciben radioisótopos con licencia específica:

La recepción, uso, transferencia y eliminación de los materiales radiactivos se rigen por la normativa y las condiciones de la licencia en cuestión.

**ATENCIÓN:** La radiactividad impresa en el interior del paquete puede diferir ligeramente de la impresa en la etiqueta de la caja y en la del vial del trazador. La etiqueta de la caja y la del trazador indican la cantidad real de radiactividad en la fecha de la calibración, mientras que el impreso del interior del paquete indica la radiactividad teórica del equipo.

#### ESQUEMA DEL ENSAYO

- 1 - PREPARE LOS REACTIVOS. DILUYA LAS MUESTRAS 1:51.
- 2 - MARQUE LOS TUBOS RECUBIERTOS POR DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUYA LOS REACTIVOS SEGÚN EL SIGUIENTE ESQUEMA Y AGITE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN:

REACTIVOS \ TUBOS	T	CAL 0-5	MUESTRAS DILUIDAS
CALIBRADORES	—	50 $\mu\text{L}$	—
MUESTRAS DILUIDAS	—	—	50 $\mu\text{L}$
TAMPÓN DE INCUBACIÓN	—	500 $\mu\text{L}$	500 $\mu\text{L}$

- 4 - INCUBE DURANTE 2 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE EN AGITACIÓN.
- 5 - ASPIRE LA MEZCLA DE INCUBACIÓN Y LAVE 2 VECES CON 2 mL DE TAMPÓN DE LAVADO.
- 6 - DISTRIBUYA 500  $\mu\text{L}$  DE TRAZADOR EN TODOS LOS TUBOS.
- 7 - INCUBE DURANTE 2 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE EN AGITACIÓN.
- 8 - ASPIRE EL TRAZADOR Y LAVE 2 VECES CON 2 mL DE TAMPÓN DE LAVADO.
- 9 - MIDA LA RADIOACTIVIDAD DE LOS TUBOS.

## TESTE IMUNO-RADIOMÉTRICO DOS ANTICORPOS ANTI-TIROGLOBULINA

### Procedimento para a determinação quantitativa dos auto-anticorpos anti-tiroglobulina humana (IgG anti-hTg) em amostras de soro ou plasma humano

Só para uso in vitro

#### 1. INTRODUÇÃO

As doenças auto-imunes da tiróide compreendem uma vasta série de distúrbios clínicos diferentes, que variam do hipotiroidismo (tiroidite de Hashimoto), ao hipertiroidismo (doença de Basedow), às afecções subclínicas em indivíduos assintomáticos eutiroideus ou hipotiroideus dum ponto de vista bioquímico. A ligação entre estes extremos é a presença de auto-anticorpos em circulação dirigidos contra os antigénios da tiróide.

Na tiroidite auto-imune humana foram descritos três sistemas distintos de antigénio-anticorpo – comumente presentes no tecido normal da tiróide – que envolvem respectivamente a hTg, um antigénio coloidal e um antigénio microssomal (peroxidase da tiróide). A determinação da presença de auto-anticorpos anti-hTg, pertencentes principalmente à classe IgG (IgG anti-hTg) é de grande utilidade clínica no diagnóstico das doenças autoimunes da tiróide, que incluem a doença de Basedow, a tiroidite de Hashimoto e o mixedema idiopático.

O nível de IgG anti-hTg não está relacionado com as concentrações de T<sub>3</sub> ou de T<sub>4</sub>; de facto, os auto-anticorpos anti-hTg podem estar presentes em indivíduos eutiroideus, hipotiroideus ou hipertiroideus.

As doenças auto-imunes da tiróide são mais frequentes nas mulheres, nas quais a prevalência de auto-anticorpos aumenta com a idade, de aproximadamente 10% por volta dos vinte anos a 30% após os sessenta. Estes níveis de auto-anticorpos podem provocar tiroidite crónica com conseqüente hipotiroidismo.

No mixedema idiopático, observam-se níveis significativos de auto-anticorpos característicos dos estágios terminais de tiroidite auto-imune crónica atrofica. Nos doentes mais jovens, a presença de bócio sólido e de elevados níveis de auto-anticorpos indica, geralmente, tiroidite de Hashimoto, que caracteriza-se pela redução progressiva da função da tiróide com conseqüente hipotiroidismo.

Na doença de Basedow, o bócio tóxico está associado com a tiroidite crónica, como confirmado pela presença de níveis elevados de auto-anticorpos na circulação. Em todos os casos, a monitorização dos níveis de auto-anticorpos é frequentemente útil para controlar a terapia e para identificar os membros da família dos doentes com alto risco de desenvolver uma doença auto-imune.

#### 2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

O método utilizado é de tipo imuno-radiométrico (IRMA). Na primeira fase, a IgG anti- hTg contida nos calibradores ou nas amostras liga a hTg adsorbida na fase sólida. Na segunda fase, a proteína A marcada com <sup>125</sup>I (marcador <sup>125</sup>I) adicionada liga o complexo IgG-hTg em fase sólida. Após as duas incubações, a quantidade de proteína A marcada ligada à fase sólida é proporcional à concentração de IgG anti-hTg presente nos calibradores ou nas amostras. No final de cada incubação, o material não ligado é removido mediante aspiração e lavagem. O método adoptado para a separação livre/ligado baseia-se no uso dos tubos revestidos, onde a hTg é fixada nas paredes dos tubos.

O teste de IgG anti-hTg utiliza como marcador a proteína A, uma proteína da parede celular da bactéria *Staphylococcus aureus* que tem a capacidade de ligar o fragmento Fc das moléculas de IgG.

#### 3. REAGENTES FORNECIDOS NO DISPOSITIVO

Tubos revestidos	100
Marcador <sup>125</sup> I	1 frasco
Calibradores de anti-tiroglobulina	6 frascos
Soro de controlo	1 frasco
Dilúente das amostras	2 frascos
Tampão de incubação	1 frasco
Tampão de lavagem	2 frascos
Número de testes	100

**ARMAZENAGEM:** Depois da recepção, armazene o dispositivo a 2-8°C. Não congele. Após a abertura, os reagentes deste dispositivo permanecem estáveis até ao final do prazo de validade do dispositivo, se mantidos de modo adequado. O dispositivo foi projectado para 4 execuções analíticas se utilizado durante o dia à temperatura ambiente e conservado durante a noite a 2-8°C.

Não utilize reagentes expirados. O prazo de validade do dispositivo está descrito na etiqueta externa e corresponde ao prazo de validade do marcador. O prazo de validade de cada reagente está descrito na etiqueta de cada frasco.

Quando reconstituir o conteúdo dos frascos, agite devagarinho para evitar a formação de espuma.

Não misture reagentes de lotes diferentes.

### 3.1. Tubos revestidos

A superfície interna de cada tubo é revestida com hTg biotinizada altamente purificada. Antes de usar, deixe os tubos revestidos à temperatura ambiente antes de abrir a embalagem, para evitar condensação de humidade.

Conserve os tubos não utilizados certificando-se de que a embalagem esteja bem fechada. Não misture lotes diferentes de tubos revestidos.

### 3.2. Marcador $^{125}\text{I}$ (vermelho): reagente pronto a usar

O frasco contém 52 mL de proteína A marcada com  $^{125}\text{I}$ , albumina sérica bovina, tampão fosfato-citrato, conservantes e um corante vermelho inerte. A radioactividade máxima é 296 kBq (8  $\mu\text{Ci}$ ) na data de calibração.

### 3.3. Calibradores de anti-tiroglobulina: reagente pronto a usar

Cada frasco contém 0,5 mL de soro humano pré-diluído contendo IgG anti-hTg, soro de bezerro, albumina sérica bovina, tampão PBS e conservantes. As concentrações dos calibradores são as seguintes: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 UI/mL. Os calibradores do dispositivo estão referenciados ao Padrão Internacional MRC 65/93. Os calibradores do dispositivo são comutáveis com as amostras em análise quando foram utilizados com os reagentes e com o procedimento operativo deste teste de diagnóstico *in vitro*, consoante as recomendações do fabricante.

Dado que os calibradores foram pré-diluídos em 1:51 e foram determinados seus respectivos valores, a concentração das amostras em UI/mL pode ser calculada directamente por interpolação da curva de calibração. É necessário introduzir um factor de multiplicação só se a diluição da amostra for superior a 1:51.

### 3.4. Soro de controlo: reagente liofilizado

O frasco contém soro humano pré-diluído, anticorpos anti-tiroglobulina, soro de bezerro, albumina sérica bovina, tampão PBS e conservantes. O intervalo de concentrações de cada controlo é referido no certificado de análise e indica os limites estabelecidos pela DiaSorin para os valores de controlo que podem ser obtidos em ensaios fidedignos.

Reconstitua o conteúdo do frasco com 1 mL de água destilada. A solução resultante é estável a 2-8°C até ao final do prazo de validade do dispositivo. Recomenda-se a não diluir mais o soro de controlo. Leia directamente o valor da curva de calibração.

### 3.5. Diluente das amostras: reagente pronto a usar

Cada frasco contém 50 mL de tampão PBS, soro de bezerro, albumina sérica bovina e conservantes.

O reagente é comum aos dispositivos AB-TPOK-3 e AB-HTGK-3.

### 3.6. Tampão de incubação (azul): reagente pronto a usar

O frasco contém 52 mL de solução de tampão TRIS, albumina sérica bovina, detergentes, conservantes e um corante azul inerte.

### 3.7. Tampão de lavagem: reagente em solução (10x)

Cada frasco contém 50 mL de Triton X-100 a 0,5% e solução salina. Dilua o inteiro conteúdo de cada frasco com água desmineralizada, obtendo uma solução de 500 mL. A solução resultante é estável a 2-8°C até ao final do prazo de validade do dispositivo. A solução é utilizada para lavar os tubos revestidos.

## 4. EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS, MAS NÃO FORNECIDOS

- Água destilada e desmineralizada.
- Material de vidro.
- Tubos descartáveis de plástico.
- Micropipetas com pontas descartáveis de 10, 50  $\mu\text{L}$  (exactidão  $\pm 3\%$ , precisão 2%) e 500, 1000  $\mu\text{L}$  (exactidão  $\pm 2\%$ , precisão 1%).
- Suporte para tubos.
- Agitador Vortex.
- Agitador rotativo com velocidade de agitação de 300-350 rpm.
- Sistema para distribuir e aspirar o tampão de lavagem em condições de distribuir 2-3 mL por ciclo de lavagem durante dois ciclos de lavagem.
- Contador gama para contar o iodo  $^{125}\text{I}$  (definição da janela do contador: 15-80 keV - eficiência do contador: 70% - tempo de contagem: 1 min). Se a eficiência do contador é inferior a 60%, o tempo de contagem deve ser prolongado a 2 min.



## 5. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Pode-se utilizar tanto soro como plasma humano para o teste. Os anticoagulantes citrato, EDTA e heparina foram testados e podem ser utilizados neste teste. O sangue deve ser colhido assepticamente por punção venosa, deixado coagular e o soro deve ser separado do coágulo tão cedo quanto possível. As amostras que contêm partículas sólidas, turvas, lipémicas ou com fragmentos de eritrócitos podem necessitar de clarificação por filtração ou centrifugação antes de serem testadas. As amostras muito hemolisadas ou lipémicas, bem como as amostras que contêm partículas sólidas ou que exibem evidente contaminação bacteriana, não devem ser utilizadas. Se o ensaio for realizado dentro de 24 horas após a colheita das amostras, estas devem ser conservadas a 2-8°C; em caso contrário, estas devem ser subdivididas em alíquotas e conservadas a -20°C ou a temperatura inferior. Se as amostras estiverem congeladas, deixe-as descongelar e misture bem antes de utilizar. Evite ciclos repetidos de congelação e descongelação.

### Diluição das amostras

As amostras devem ser diluídas a 1:51 com o diluente das amostras (3.5) antes do teste. Distribua 10 µL de amostra e 500 µL de diluente das amostras nos respectivos tubos e misture com um agitador Vortex.

Se foram previstas concentrações elevadas de IgG anti-hTg, dilua ainda mais com o diluente das amostras. Os *calibradores e o soro de controlo estão prontos a usar e não devem ser diluídos.*

## 6. PROCEDIMENTO DO TESTE

Deixe todos os reagentes à temperatura ambiente (20-25°C) antes do teste. Execute o teste ao menos em duplicado. Os calibradores devem ser testados em cada série de amostras de doentes. Os calibradores e as amostras devem ser submetidos ao mesmo processo e tempo de incubação.

Execute todas as etapas do teste na ordem apresentada, sem muita demora entre cada etapa.

Utilize uma ponta descartável para dispensar cada calibrador e amostra.

Distribua os reagentes *no fundo dos tubos revestidos* segundo o esquema abaixo:

reagentes \ tubos	Calibradores 0-5	Amostras diluídas
Calibradores	50 µL	–
Amostras diluídas	–	50 µL
Tampão de incubação	500 µL	500 µL

- **Agite** o conteúdo dos tubos e **incube durante duas horas à temperatura ambiente** em agitação (300-350 rpm).
- **Aspire** com cuidado a mistura de incubação e **lave** duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem. Verifique se o líquido foi eliminado completamente, controlando se a ponta da pipeta de aspiração toca o fundo dos tubos revestidos. A presença de gotas aderentes nas paredes dos tubos revestidos pode provocar baixa reprodutibilidade ou resultados não fiáveis. Não devem permanecer resíduos do corante.
- **Distribua 500 µL de marcador** em todos os tubos. Prepare dois tubos não revestidos para calcular a actividade total que contêm só 500 µL de marcador e deixe-os de lado até ao momento da contagem.
- **Incube durante duas horas à temperatura ambiente** em agitação (300-350 rpm).
- **Aspire** com cuidado o marcador e **lave** duas vezes com 2 mL de tampão de lavagem. Actue como descrito acima.
- **Meça a radioactividade** dos tubos.

## 7. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcule a média das contagens para cada grupo de tubos, após ter subtraído o valor do fundo. Calcule a média das contagens de calibradores e amostras como percentagem em relação à actividade total:

$$B/T\% = \frac{\text{contagem média de calibradores ou amostras}}{\text{contagem média da actividade total}} \times 100$$

Coloque as coordenadas em papel di-logarítmico e faça a curva utilizando a ordenada (eixo dos y) para o valor médio da percentagem calculada para cada calibrador em função da concentração de IgG anti-hTg expressa em UI/mL na abcissa (eixo dos x). Desta forma obtém-se uma curva de calibração (Fig. 1). Directamente da curva de calibração, leia a concentração de IgG anti-hTg de cada amostra expressa em UI/mL. Se a amostra tiver sido diluída além do factor inicial de 1:51, a concentração de IgG anti-hTg encontrada deve ser multiplicada pelo factor de diluição superior a 1:51, tendo em conta que os calibradores já estão pré-diluídos a 1:51.

### Exemplo de cálculo

Os seguintes dados devem ser considerados apenas como exemplo e não devem ser usados no lugar de dados obtidos pelo utilizador.

Descrição	Contagens	B/T x 100
Actividade total	78.581	–
Calibrador zero/diluyente das amostras	85	–
100 UI/mL	1.313	1,6
200 UI/mL	2.663	3,3
500 UI/mL	6.445	8,2
1500 UI/mL	19.955	25,3
6500 UI/mL	40.869	52,0
Amostra	2.977	3,7

Interpolando da curva de calibração, a amostra resulta conter 230 UI/mL de IgG anti-hTg.

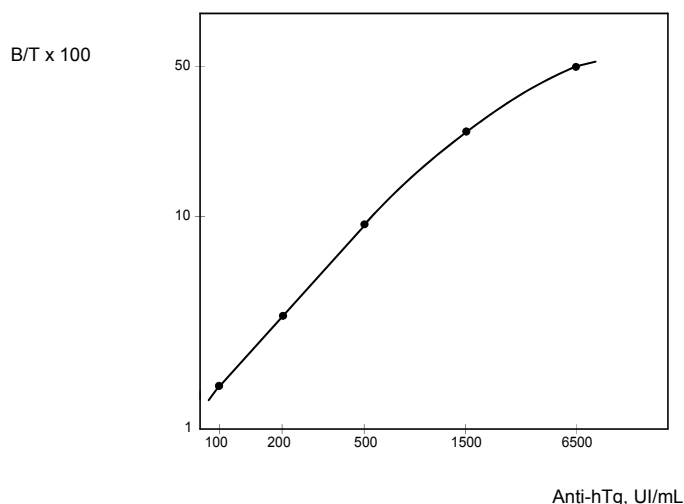


Fig. 1

### Interpretação dos resultados

O primeiro calibrador (100 UI/mL) representa o valor limite (*cut-off*) do sistema.

Consideram-se positivas pela presença de IgG anti-hTg as amostras com valor igual ou maior que o valor limite. As amostras com valor abaixo do valor limite devem ser consideradas negativas.

*Todavia, aconselha-se a considerar duvidosas as amostras com valores de IgG anti-hTg compreendidos dentro da faixa de  $\pm 20\%$  do valor limite.*

*Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência clinicamente relevantes.*

### 8. VALORES ESPERADOS

Durante os estudos clínicos, foram considerados 211 indivíduos. Nesta população, os indivíduos foram classificados negativos, positivos e duvidosos com um teste de referência. Em 96% dos indivíduos classificados negativos com o dispositivo DiaSorin, foram encontrados valores de IgG anti-hTg abaixo de 100 UI/mL e em 100% dos indivíduos classificados positivos, foram encontrados valores de IgG anti-hTg acima de 100 UI/mL.

Contudo, os valores indicados acima são somente indicativos. Recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência clinicamente relevantes.

### 9. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPENHO

#### 9.1. Especificidade analítica

A especificidade analítica pode ser definida como a capacidade do teste de detectar com cuidado o analito específico na presença de factores potencialmente interferentes na matriz da amostra (ex. anticoagulantes, hemólise, efeitos de tratamentos da amostra) ou de reacções cruzadas com analitos potencialmente interferentes.

**Interferências.** Estudos controlados de substâncias ou condições potencialmente interferentes demonstraram que o desempenho do ensaio não é afectado por anticoagulantes (citrato, EDTA, heparina), leve hemólise (até a 20 mg/dL de hemoglobina), lipemia (até a 10000 mg/dL de triglicéridos), bilirrubinemia (até a 50 mg/dL de bilirrubina).

**Reacções cruzadas.** O uso de hTg extremamente purificada para revestir os tubos reduz a possibilidade de interferências devidas a proteínas não específicas. Não foram observadas reacções cruzadas devidas à presença de auto-anticorpos anti-TPO até a uma concentração de 1000 U/mL.

### 9.2. Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica também pode ser expressa como o limite de detecção, ou seja, a quantidade mínima de analito específico detectável pelo teste. O limite de detecção é de 6 UI/mL com um limite de confiança de 95%. Este foi calculado como a concentração aparente de analito que pode ser distinguida do calibrador zero (diluído das amostras), isto é, dois desvios padrão acima do zero.

### 9.3. Precisão

Diferentes grupos de amostras, que contêm diferentes concentrações de analito específico, foram testados para determinar a repetibilidade e a reprodutibilidade do teste (isto é, a variabilidade intra e interensaio).

Repetibilidade	A	B	C
Número de determinações	10	10	10
Média (UI/mL)	115	951	2924
Desvio padrão	3,3	42,7	105,0
Coefficiente de variação (%)	2,9	4,4	3,6

Reprodutibilidade	A	D	E
Número de determinações	10	10	10
Média (UI/mL)	119	793	2361
Desvio padrão	13,9	53,0	177,0
Coefficiente de variação (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Exactidão

A exactidão do teste foi controlada mediante o teste de diluição.

**Teste de diluição.** Foram testadas diluições em série de dois soros que contêm uma concentração elevada de IgG anti-hTg efectuadas no diluído das amostras.

Diluição	Concentração esperada, UI/mL	Concentração medida, UI/mL	% Recuperação
puro	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
puro	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,40	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Efeito de saturação a altas concentrações

Ao dosar amostras que contêm concentrações de anticorpos extremamente elevadas num método *sanduíche* com duas incubações, é possível obter níveis aparentes de anticorpo inferiores ao real por efeito da saturação. Um método bem optimizado exclui, todavia, a obtenção de resultados grosseiramente subestimados (como é possível verificar nos testes *sanduíche* com uma incubação).

Foram testadas concentrações de IgG anti-hTg até a 100 mil UI/mL e foi observado que estas concentrações geram um sinal analítico sempre maior que o do calibrador mais concentrado (curva de saturação). Para quantificar as amostras de maneira correcta, as amostras que contêm níveis de IgG anti-hTg maiores que o do calibrador mais concentrado devem ser diluídas com o diluente das amostras e dosadas de novo. Os resultados devem ser multiplicados pelo factor de diluição superior a 1:51 para obter os níveis de IgG anti-hTg das amostras não diluídas.

#### **10. LIMITAÇÕES DO TESTE**

O uso do teste radioimunológico reduziu drasticamente os resultados falsos positivos. Todavia, o diagnóstico não deve basear-se no resultado dum único teste, mas deve ser determinado conjuntamente com outros dados clínicos e meios de diagnóstico, bem como em associação com o parecer do médico.

Contaminações bacterianas ou ciclos repetidos de congelação e descongelação das amostras podem afectar os resultados do teste.

Para obter resultados fiáveis, é necessário seguir de maneira correcta as instruções de uso e possuir uma adequada formação técnica. Em especial, é essencial uma boa precisão na preparação e distribuição dos reagentes, na aspiração e na lavagem. Resultados não reprodutíveis podem ser devidos a erros de execução, tais como:

- troca das tampas dos frascos
- uso da mesma ponta para distribuir soluções ou amostras diferentes
- frascos deixados abertos durante um longo período de tempo
- exposição dos reagentes ou amostras ao calor intenso ou a fontes de contaminação bacteriana
- aspiração da mistura de incubação e lavagem dos tubos inadequadas
- contaminação dos rebordos dos tubos com o marcador ou com as amostras
- oscilações casuais ou manutenção inadequada do contador gama
- troca de reagentes de diferentes lotes.

#### **11. ADVERTÊNCIAS E PRECAUÇÕES**

Os componentes do dispositivo contêm azida sódica como conservante. Dado que a azida sódica pode formar azidas de chumbo ou de cobre explosivas nos tubos, é aconselhável deixar fluir água com abundância nas descargas após a eliminação de soluções que contêm azida sódica (Directiva 99/45/EC).

R 22 – Nocivo por ingestão.

R 31 – Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos.

S 28 – Após contacto com a pele, lavar imediata e abundantemente com água.

S 45 – Em caso de acidente ou de indisposição, consultar imediatamente o médico (se possível mostrar-lhe o rótulo).

Todas as unidades de soro e plasma utilizadas para produzir os componentes deste dispositivo foram testadas para a presença de HBsAg, anti-HCV e anti-HIV-1/2 e os resultados encontrados foram não reactivos. Contudo, como nenhum método pode oferecer segurança absoluta de que agentes patogénicos estejam ausentes, todas as amostras de origem humana devem ser consideradas potencialmente infecciosas e manuseadas com cuidado.

#### **12. REGRAS DE SEGURANÇA**

- Não coma, beba, fume ou aplique cosméticos durante a execução do teste.
- Não pipete as soluções com a boca.
- Evite o contacto directo com todos os materiais potencialmente infecciosos usando equipamentos de protecção como luvas descartáveis, óculos e aventais. Lave bem as mãos no final de cada teste.
- Evite salpicos ou formação de aerossóis. Qualquer reagente derramado deve ser lavado com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% e tratado como material residual potencialmente infeccioso.
- Todas as amostras, os reagentes biológicos e os materiais utilizados nos testes devem ser considerados potencialmente capazes de transmitir agentes infecciosos. Por isso, os resíduos devem ser eliminados conforme as regras emitidas pelos órgãos autorizados que administram o laboratório e conforme o regulamento específico de cada país. O material descartável deve ser incinerado, os resíduos líquidos devem ser descontaminados com uma solução de hipoclorito de sódio a 5% no mínimo durante meia hora. Qualquer material reutilizado deve ser autoclavado usando a abordagem de sobredestruição (*overkill*) (USP 24, 2000, p. 2143). Em geral, uma hora a 121°C é considerado um tempo de esterilização adequado, mas os utilizadores devem verificar a eficiência do seu sistema de descontaminação através de validação e utilização rotineira de indicadores biológicos.

#### **13. REGRAS BÁSICAS DE SEGURANÇA CONTRA RADIAÇÃO**

##### **Reagentes com Iodo-125**

Este kit contém material radioactivo que não excede 8,12 µCi (300 kBq) de Iodo-125. Devem ser tomadas todas as precauções apropriadas e usadas boas práticas laboratoriais no armazenamento, manuseamento e eliminação deste material.

Para médicos ou instituições que recebam rádio-isótopos sob uma licença geral:

Este material radioactivo pode ser recebido, adquirido, possuído e usado apenas por médicos, veterinários na prática da medicina veterinária, laboratórios clínicos e hospitais, e apenas para testes laboratoriais ou testes clínico in vitro que não envolvam administração interna ou externa do material, ou a radiação deste para seres humanos ou animais. A sua recepção, aquisição, posse, uso e transferência estão sujeitos aos regulamentos e à licença geral da Comissão Reguladora Nuclear dos Estados Unidos do estado com o qual a Comissão chegou a acordo para o exercício da autoridade reguladora.

1. O armazenamento de qualquer material radioactivo deve ser limitado a uma área especificamente designada.
2. O acesso a materiais radioactivos deve ser limitado apenas a pessoal autorizado.
3. Não pipete material radioactivo por via oral.
4. Não coma nem beba nas áreas designadas para trabalho radioactivo.
5. As áreas onde possam ocorrer fugas devem ser limpas e em seguidas lavadas com detergente álcali ou solução de descontaminação radiológica. Qualquer vidro usado deve ser enxaguado completamente em água antes de lavar qualquer outro material de vidro do laboratório.

Para médicos ou instituições que recebem rádio-isótopos sob uma licença específica:

A recepção, uso, transferência e eliminação de materiais radioactivos estão sujeitos aos regulamentos e condições de sua licença específica.

**ATENÇÃO:** O símbolo de radioactividade impresso na embalagem pode ser ligeiramente diferente do símbolo impresso no rótulo da caixa e no rótulo do frasco do traçador. O rótulo da caixa e do frasco do traçador indicam a quantidade real de radioactividade na data de calibragem enquanto a embalagem indica a radioactividade teórica no kit.

#### ESQUEMA DO TESTE

- 1 - PREPARE OS REAGENTES. DILUA AS AMOSTRAS A 1:51.
- 2 - IDENTIFIQUE OS TUBOS REVESTIDOS EM DUPLICADO.
- 3 - DISTRIBUA OS REAGENTES DE ACORDO COM O ESQUEMA ABAIXO E AGITE A MISTURA DE INCUBAÇÃO:

REAGENTES \ TUBOS	T	CAL 0-5	AMOSTRAS DILUÍDAS
CALIBRADORES	-	50 µL	-
AMOSTRAS DILUÍDAS	-	-	50 µL
TAMPÃO DE INCUBAÇÃO	-	500 µL	500 µL

- 4 - INCUBE DURANTE DUAS HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE EM AGITAÇÃO.
- 5 - ASPIRE A MISTURA DE INCUBAÇÃO E LAVE DUAS VEZES COM 2 mL DE TAMPÃO DE LAVAGEM.
- 6 - DISTRIBUA 500 µL DE MARCADOR EM TODOS OS TUBOS.
- 7 - INCUBE DURANTE DUAS HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE EM AGITAÇÃO.
- 8 - ASPIRE O MARCADOR E LAVE DUAS VEZES COM 2 mL DE TAMPÃO DE LAVAGEM.
- 9 - MEÇA A RADIOACTIVIDADE DOS TUBOS.

## SOUPRAVA PRO IMUNORADIOMETRICKÉ STANOVENÍ PROTILÁTEK PROTI TYREOGLOBULINU

### Postup pro kvantitativní stanovení autoprotilátek proti lidskému tyreoglobulinu (IgG proti hTg) ve vzorcích lidského séra nebo plazmy

Určeno pouze pro diagnostické použití in vitro

#### 1. ÚVOD

Autoimunitní nemoci štítné žlázy zahrnují široké spektrum různých klinických poruch od hypotyreózy (Hashimotovy choroby) nebo hypertyreózy (Graves-Basedowovy choroby) po subklinické nemoci u asymptomatických eutyroidních nebo biochemicky hypotyreoidních subjektů. Spojovacím článkem mezi těmito extrémy je přítomnost autoprotilátek v séru, jež jsou zaměřeny na antigeny štítné žlázy.

U lidské tyreoiditidy (autoimunitní nemoci štítné žlázy) byly popsány tři odlišné systémy antigen-protilátka – běžně se vyskytující v normální tkáni štítné žlázy - zahrnující hTg, koloid a mikrozmolární antigen (peroxidázu štítné žlázy).

Autoprotilátky proti hTg jsou imunoglobuliny spadající převážně do třídy IgG (IgG proti hTg). Stanovení jejich přítomnosti má velký klinický význam při diagnostice autoimunitních nemocí štítné žlázy včetně Graves-Basedowovy choroby, Hashimotovy choroby a idiopatického myxedému.

Hladina IgG proti hTg nesouvisí s hladinou T<sub>3</sub> ani T<sub>4</sub>. IgG proti hTg se může ve skutečnosti vyskytovat u hypotyreoidního, eutyroidního i hypertyroidního stavu.

Tyreoidní autoimunita je častější u žen, u nichž se prevalence protilátek zvyšuje s věkem a stoupá od přibližně 10 % krátce po dvaceti letech věku do 30 % u starších šedesátnic. Takové hladiny autoprotilátek mohou vést k rozvoji chronické tyreoiditidy a následné hypotyreóze.

V případě idiopatického myxedému jsou pozorovány významné hladiny autoprotilátek, což indikuje konečnou fázi autoimunitní atrofické chronické tyreoiditidy. U mladších pacientů nález tuhé strumy v kombinaci s vysokými hladinami autoprotilátek obecně ukazuje na Hashimotovu chorobu, charakterizovanou progresivním snížením funkce štítné žlázy vedoucím k hypotyreóze.

U hypertyreózní Graves-Basedowovy choroby je toxická struma spojena s chronickou tyreoiditidou, což potvrzují vysoké hladiny autoprotilátek v séru.

Ve všech případech je sledování hladin autoprotilátek často používáno ke kontrole léčby a k identifikaci rodinných příslušníků, u nichž existuje vysoké riziko rozvoje autoimunitních poruch.

#### 2. PRINCIP STANOVENÍ

Toto stanovení je imunoradiometrická (IRMA) metoda. V první fázi stanovení se IgG proti hTg, obsažený v kalibračních roztocích nebo ve vzorcích, naváže na hTg na pevné fázi. Ve druhé fázi je přidána <sup>125</sup>I značená látka (protein A značený <sup>125</sup>I), která se naváže na komplex hTg-IgG na pevné fázi. Po druhé inkubaci je množství <sup>125</sup>I značené látky navázané na pevnou fázi přímo úměrné koncentraci IgG proti hTg, přítomného v kalibračních roztocích nebo ve vzorcích, které mají být analyzovány. Na konci každé inkubace je nenavázaný materiál odstraněn odsátím a promytím. Metoda použitá k separaci vázané a volné látky je založena na použití potahovaných zkumavek, přičemž na stěny zkumavek je nanesen hTg.

Stanovení IgG proti hTg využívá jako značenou látku protein A, což je protein bakteriální buněčné stěny z bakterie *Staphylococcus aureus*, schopný vázat Fc fragment molekul IgG.

#### 3. ČINIDLA DODÁVANÁ V SOUPRAVĚ

Zkumavky s nanesenou vrstvou <sup>125</sup> I značená látka	100 1 lahvička
Kalibrační roztoky protilátek proti tyreoglobulinu	6 lahviček
Kontrolní sérum	1 lahvička
Roztok pro ředění vzorků	2 lahve
Inkubační pufr	1 láhev
Promývací pufr	2 lahve
Počet zkumavek	100

**UCHOVÁVÁNÍ:** Po přijetí je nutné soupravu uchovávat při teplotě 2 - 8 °C. Nezmrazujte. Po otevření jsou činidla v této soupravě při správném skladování stabilní, dokud neuplyne datum jejich expirace. Tato souprava je určena k provedení 4 běhů stanovení za předpokladu, že je během dne používána při pokojové teplotě a přes noc skladována při teplotě 2 - 8 °C.

Činidla nelze použít po uplynutí data expirace. Datum expirace soupravy je uvedeno na vnějším štítku a odpovídá datu expirace izotopem značené látky. Datum expirace jednotlivých složek je uvedeno na štítku příslušné lahvičky.

Při rekonstituci obsahu lahviček míchejte šetrně, aby nedocházelo k napěnění.

Činidla z různých šarží se nesmí navzájem kombinovat.

### 3.1. Zkumavky s nanosenou vrstvou

Na vnitřní povrch každé zkumavky je nanášena vrstva vysoce purifikovaného biotinylovaného hTg.

*Před použitím, ještě před otevřením krabice, nechejte zkumavky s nanosenou vrstvou temperovat při pokojové teplotě, aby nedocházelo ke kondenzaci vlhkosti.*

*Krabici s nepoužitými zkumavkami pečlivě uzavřete. Nekombinujte navzájem zkumavky s nanosenou vrstvou různých šarží.*

### 3.2. <sup>125</sup>I značená látka (červená): činidlo připravené k použití

Lahvička obsahuje 52 ml proteinu A značeného <sup>125</sup>I, BSA, fosfáto-citrátový pufr, konzervační látky a inertní červené barvivo. Radioaktivita ke dni kalibrace je 296 kBq (8 µCi) nebo nižší.

### 3.3. Kalibrační roztoky protiláték proti tyreoglobulinu: činidlo připravené k použití

Každá lahvička obsahuje 0,5 ml předem naředěného lidského séra obsahujícího IgG proti hTg, telecí sérum, BSA, pufr PBS a konzervační látky. Koncentrace kalibračního roztoku jsou následující: 0 - 100 - 200 - 500 - 1 500 - 6 500 IU/ml. Referenčním standardem pro kalibrační roztoky soupravy je mezinárodní standard MRC 65/93. *Kalibrační roztoky soupravy vykazují zaměnitelnost s patientskými vzorky při použití činidel a pracovního postupu tohoto diagnostického testu in vitro podle doporučení výrobce.*

*Protože kalibrační roztoky byly předem naředěny v poměru 1:51 a podle toho byly přiřazeny hodnoty, lze koncentrace neznámých vzorků v IU/ml určit přímo interpolací z kalibrační křivky. Násobení faktorem je nutné pouze v případě, kdy je ředění vzorku vyšší než 1:51.*

### 3.4. Kontrolní sérum: lyofilizované činidlo

Lahvička obsahuje předem naředěné lidské sérum, protilátky proti hTg, telecí sérum, BSA, pufr PBS a konzervační látky. Rozmezí koncentrací každého kontrolního séra je uvedeno na osvědčení o analýze a představuje limity stanovené společností DiaSorin pro hodnoty kontrolních sér, které lze získat pomocí spolehlivých stanovení.

Rekonstituujte obsah lahvičky přidáním 1 ml destilované vody. Výsledný roztok je stabilní při teplotě 2 - 8 °C po dobu použitelnosti soupravy. Kontrolní sérum *dále neředte*. Hodnoty odečítejte přímo z kalibrační křivky.

### 3.5. Roztok pro ředění vzorků: činidlo připravené k použití

Každá láhev obsahuje 50 ml pufru PBS, telecí sérum, BSA a konzervační látky.

*Toto činidlo je společné pro soupravy AB-TPOK-3 a AB-HTGK-3.*

### 3.6. Inkubační pufr (modrý): činidlo připravené k použití

Láhev obsahuje 52 ml pufrálního roztoku TRIS, BSA, detergenty, konzervační látky a inertní modré barvivo.

### 3.7. Promývací pufr: činidlo v roztoku (10x)

Každá láhev obsahuje 50 ml fyziologického roztoku a 0,5 % detergentu Triton X-100.

Naředte obsah každé lahvičky na 500 ml deionizovanou vodou. Výsledný roztok je stabilní při teplotě 2 - 8 °C po dobu použitelnosti soupravy. Toto činidlo slouží k opláchnutí zkumavek s nanosenou vrstvou.

## 4. POTŘEBNÝ MATERIÁL A VYBAVENÍ, KTERÉ NEJSOU SOUČÁSTÍ DODÁVKY

- Destilovaná nebo deionizovaná voda.
- Laboratorní sklo.
- Polystyrénové zkumavky na jedno použití.
- Mikropipety s jednorázovými špičkami (10, 50, 500, 1000 µl) (10, 50 µl: pravdivost  $\pm 3$  %, přesnost 2 %; 500, 1000 µl: pravdivost  $\pm 2$  %, přesnost 1 %).
- Stojan na zkumavky.
- Míchačka „vortex”.
- Horizontální třepačka schopná dosáhnout rychlosti třepání 300 - 350 otáček/min.
- Zařízení pro dávkování a odsávání promývacího pufru, schopné dodávat 2 - 3 ml na promývací cyklus po dva promývací cykly.
- Čítač záření gama vhodný pro počítání impulzů <sup>125</sup>I (nastavení okna čítače: 15 - 80 keV – účinnost čítače: 70 % – detekční čas: 1 minuta). Je-li účinnost čítače nižší než 60 %, detekční čas je nutné prodloužit na 2 minuty.

## 5. ODBĚR A PŘÍPRAVA VZORKŮ

Lze použít lidské sérum nebo plazmu. S tímto stanovením byly testovány a jako antikoagulační látky mohou být používány citrát, EDTA a heparin. Krev je nutné odebrat asepticky ze žíly, nechat ji vysrážet a poté co nejdříve oddělit sérum od sraženiny. U vzorků, které obsahují pevné částice, jsou zakalené, lipemické nebo obsahují zbytky erytrocytů, může být před provedením testu nutné čištění filtrací nebo centrifugací. Vysoce hemolyzované nebo lipemické vzorky a vzorky, které obsahují pevné částice nebo zjevnou mikrobiální kontaminaci, nelze pro stanovení použít. Je-li stanovení provedeno do 24 hodin od odběru vzorků, je nutné vzorky uchovávat při teplotě 2 - 8 °C; jinak je nutné vzorky rozdělit na poměrné díly a uchovávat hluboce zmrazené (při teplotě -20 °C nebo nižší). Pokud jsou vzorky uchovávány zmrazené, rozmražené vzorky před provedením testu dobře promíchejte. Zabraňte opakovanému zmrazování a rozmrazování vzorků.

### Ředění vzorku

Před stanovením zředěte všechny vzorky v poměru 1:51 roztokem pro ředění vzorků (3.5). Do polystyrénových zkumavek dávkujte 10 µl vzorku a 500 µl roztoku pro ředění vzorků a promíchejte na míchačce vortex. Jsou-li očekávány vysoké hladiny IgG proti hTg, je nutné provést další ředění roztokem pro ředění vzorků, dodaným v soupravě. *Kalibrační roztoky a kontrolní sérum jsou připraveny k použití a nesmí být ředěny.*

### 6. POSTUP STANOVENÍ

Před stanovením vytemperujte všechna činidla na pokojovou teplotu (20 - 25 °C). Stanovení provádějte alespoň ve dvou paralelách. S každou sérií vzorků pacientů musí být stanoveny i kalibrační roztoky. Kalibrační roztoky a vzorky se musí zpracovat stejným postupem a se stejnou dobou inkubace. Provedte všechny kroky stanovení v uvedeném pořadí bez podstatných prodlev mezi jednotlivými kroky. K dávkování každého kalibračního roztoku a vzorku se musí použít čistá špička na jedno použití.

- Činidla dávkujte *na dno zkumavek s nanesenou vrstvou*. Pracujte podle následujícího schématu:

Činidla	Zkumavky	Kalibrační roztoky 0 - 5	Naředěné vzorky
Kalibrační roztoky		50 µl	–
Naředěné vzorky		–	50 µl
Inkubační pufr		500 µl	500 µl

- Obsah zkumavek **promíchejte** a **inkubujte 2 hodiny při pokojové teplotě** za stálého třepání (300 - 350 ot./min.).
- Opatrně **odsajte** inkubační směs a dvakrát **promyjte** 2 ml promývacího pufru. *Špička odsávačky se musí dotýkat dna zkumavky s nanesenou vrstvou, aby byla odsáta veškerá kapalina. Pokud dostatečně neodsajete ulpělý roztok, může se snížit reprodukovatelnost a výsledky mohou být zkreslené. Nesmí být viditelná žádná stopa barviva.*
- Do všech zkumavek **nadávkuje 500 µl značené látky**. Připravte dvě zkumavky bez nanesené vrstvy pro počítání celkové aktivity, jež obsahují pouze 500 µl značené látky, a dejte je stranou až do počítání.
- **Inkubujte 2 hodiny při pokojové teplotě** za stálého třepání (300 - 350 ot./min.).
- Opatrně **odsajte** značenou látku a dvakrát **promyjte** 2 ml promývacího pufru. Pokračujte výše uvedeným postupem.
- **Změřte radioaktivitu** zkumavek.

### 7. VÝPOČET VÝSLEDKŮ

Vypočítejte střední čistý počet impulzů pro každou skupinu zkumavek. Vypočítejte poměr B/T (vázaný/celk.) pro každý kalibrační roztok a pro každý neznámý vzorek podle následujícího vzorce:

$$B/T \% = \frac{\text{střední počet impulzů pro kalibrační roztok nebo vzorek}}{\text{střední počet impulzů pro celkovou aktivitu}} \times 100$$

Střední procentuální hodnotu pro každý kalibrační roztok vyneste do log-log souřadnicové sítě na osu y jako funkci koncentrace IgG proti hTg vyjádřené v IU/ml na ose x. Takto získáte kalibrační křivku (obr. 1). Přímo z kalibrační křivky odečtete koncentraci IgG proti hTg v každém vzorku vyjádřenou jako IU/ml. Byl-li vzorek naředěn více než počátečním poměrem 1:51, musí být hodnota koncentrace protilátky získaná pro naředěný vzorek vynásobena dalším faktorem ředění. Nezapomeňte, že kalibrační roztoky jsou již naředěny v poměru 1:51.

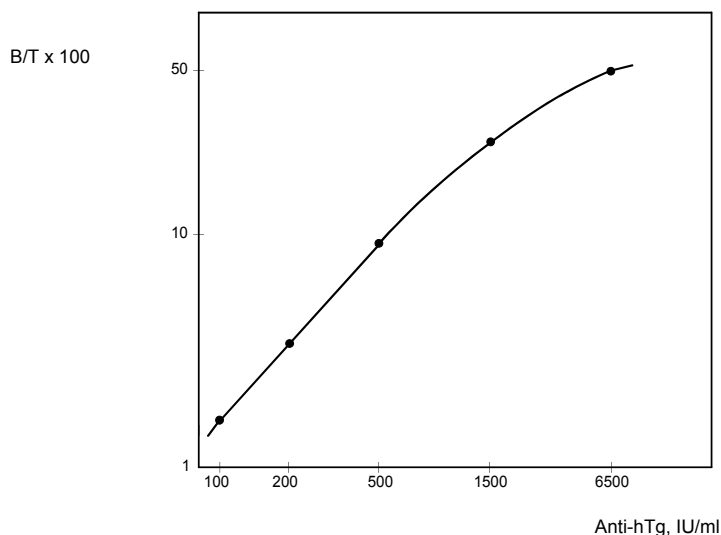
#### Příklad výpočtu

*Následující data je nutné považovat pouze za příklad a nesmí se použít náhradou za data získaná uživatelem.*

Popis	Počet impulzů za minutu (cpm)	B/T x 100
Celková aktivita	78 581	–
Kalibrační roztok nuly/roztok pro ředění vzorků	85	–
100 IU/ml	1 313	1,6
200 IU/ml	2 663	3,3
500 IU/ml	6 445	8,2
1 500 IU/ml	19 955	25,3
6 500 IU/ml	40 869	52,0
Vzorek	2 977	3,7



Interpolací z kalibrační křivky bylo zjištěno, že vzorek obsahuje 230 IU/ml IgG proti hTg.



Obr. 1

### Interpretace výsledků

První kalibrační roztok (100 IU/ml) představuje mezní hodnotu systému.

Vzorky s hodnotami IgG proti hTg vyššími než nebo rovnými mezní hodnotě by měly být vyhodnoceny jako pozitivní. Vzorky s hodnotami IgG proti hTg nižšími než mezní hodnota by měly být vyhodnoceny jako negativní.

*Vzorky s hodnotami IgG proti hTg v oblasti mezní hodnoty  $\pm 20\%$  by však měly být vyhodnoceny jako sporné.*

*Každá laboratoř si musí stanovit svá vlastní referenční rozmezí.*

### 8. PŘEDPOKLÁDANÉ HODNOTY

Během klinického hodnocení bylo vzato v úvahu 211 subjektů. Subjekty v této populaci byly ohodnoceny pomocí referenčního testu jako negativní, pozitivní a neprůkazné. 96 % subjektů ohodnocených soupravou DiaSorin jako negativní vykazovalo hodnoty IgG proti hTg pod 100 IU/ml a 100 % subjektů ohodnocených jako pozitivní vykazovalo hodnoty IgG proti hTg vyšší než 100 IU/ml.

Výše uvedené hodnoty jsou však pouze orientační: každá laboratoř si musí stanovit svá vlastní referenční rozmezí.

### 9. SPECIFICKÉ PRACOVNÍ CHARAKTERISTIKY

#### 9.1. Analytická specifčnost

Analytickou specifčnost lze definovat jako schopnost stanovení přesně detekovat konkrétní analyzovanou látku za přítomnosti potenciálně rušících faktorů v matrici vzorku (např. antikoagulačních činidel, hemolýzy, vlivů přípravy vzorku) nebo zkříženě reagujících analytů.

**Rušení.** Kontrolované studie potenciálně rušících látek nebo podmínek ukázaly, že průběh stanovení neovlivňovala antikoagulační činidla (citrát, EDTA, heparin), mírná hemolýza (až do 20 mg/dl hemoglobinu), lipémie (až do 10 000 mg/dl triglyceridů) ani bilirubinémie (až do 50 mg/dl bilirubinu).

**Zkřížené reakce.** Použití vysoce purifikovaného hTg navázaného na pevnou fázi omezuje možnost rušení nespecifickými proteiny.

Nebyla pozorována žádná zkřížená reaktivita způsobená přítomností autoprotilátek proti TPO až do koncentrace 1 000 U/ml.

#### 9.2. Analytická citlivost

Analytická citlivost může být také vyjádřena jako detekční limit, což je minimální množství určitého analytu detekovatelného stanovením. Detekční limit je 6 IU/ml při 95% mezi spolehlivosti. Tato hodnota byla vypočítána jako patrná koncentrace analytu rozlišitelná od nulového kalibračního roztoku (roztoku pro ředění vzorků), tj. o dvojnásobek směrodatné odchylky vyšší než nula.

### 9.3. Přesnost

Byly analyzovány různé skupiny vzorků obsahujících různé koncentrace určitého analytu s cílem určit opakovatelnost a reprodukovatelnost stanovení (tj. variabilitu v rámci stanovení a mezi stanoveními).

Opakovatelnost	A	B	C
Počet stanovení	10	10	10
Střední hodnota (IU/ml)	115	951	2924
Směrodatná odchylka	3,3	42,7	105,0
Variační koeficient (%)	2,9	4,4	3,6

Reprodukovatelnost	A	D	E
Počet stanovení	10	10	10
Střední hodnota (IU/ml)	119	793	2361
Směrodatná odchylka	13,9	53,0	177,0
Variační koeficient (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Pravdivost

Pravdivost stanovení byla ověřena pomocí dilučního testu.

**Diluční test.** Byla testována dvě séra s vysokou koncentrací IgG proti hTg po řadě ředění roztokem pro ředění vzorků.

Ředění	Předpokládaná koncentrace, IU/ml	Naměřená koncentrace, IU/ml	% výtěžnosti
Neředěné	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
Neředěné	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,4	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Vliv saturace vysokou koncentrací

Kdykoli jsou dvoufázovou sendvičovou metodou stanoveny vzorky obsahující mimořádně vysoké koncentrace protilátek, může saturační efekt imitovat koncentrace nižší, než jsou skutečné koncentrace. Dobře optimalizovaná metoda však vyloučí hrubě podhodnocené výsledky (které se mohou vyskytovat u jednofázových sendvičových metod).

V tomto stanovení byly měřeny koncentrace IgG proti hTg dosahující až 100 000 IU/ml a bylo pozorováno, že takové hladiny dávají analytické signály, které jsou jednoznačně nad nejvyšší koncentrací kalibračního roztoku (saturační křivka). Pro správnou kvantifikaci musí být vzorky obsahující hladiny IgG proti hTg vyšší, než je nejvyšší koncentrace kalibračního roztoku, naředěny roztokem pro ředění vzorků a stanovení musí být zopakováno. Pro získání hladin IgG proti hTg v neředěných vzorcích pak musí být výsledky kromě faktoru odpovídajícího počátečnímu ředění 1:51 vynásobeny také dodatečným faktorem ředění.

## 10. OMEZENÍ POSTUPU

Použití radioimunoanalýzy značně snížilo výskyt falešně pozitivních výsledků. Diagnóza však nemůže být založena na výsledku jediného testu, ale musí být stanovena v součinnosti s klinickým nálezem a dalšími diagnostickými postupy a také podle lékařského úsudku.

Na výsledky testu může mít vliv bakteriální kontaminace nebo opakované zmrazení a rozmrazení vzorků.

Pro získání spolehlivých výsledků je nutné zvládnutí techniky a přísné dodržování návodu. Obzvláště důležité je zejména přesné pipetování a správné odsátí a promytí.

Nereprodukovatelnost výsledků mohou způsobit metodologické faktory, zejména:

- záměna uzávěrů lahvíček,
- použití stejné špičky při odběrech z různých lahvíček nebo pro dávkování různých vzorků,
- ponechání lahvíček dlouhodobě otevřených,
- vystavení činidel nebo vzorků působení intenzivního tepla nebo zdrojům silné bakteriální kontaminace,
- nedostatečné odsátí inkubační směsi a nedostatečné opláchnutí zkumavek,
- kontaminace okrajů zkumavek značenou látkou nebo vzorky,
- nahodilé kolísání čítače záření gama nebo nesprávná manipulace s ním,
- použití činidel z různých šarží.

## 11. VAROVÁNÍ A ZVLÁŠTNÍ OPATŘENÍ

Složky testu obsahují jako konzervační látku azid sodný. Vzhledem k tomu, že azid sodný může v potrubí vytvářet výbušný azid olovnatý nebo azid měďnatý, doporučuje se dokonale propláchnout odpadní potrubí po likvidaci roztoků obsahujících azid sodný velkým množstvím vody (směrnice Rady 99/45/ES).

R 22 – Zdraví škodlivý při požití.

R 31 – Uvolňuje toxický plyn při styku s kyselinami.

S 28 – Při styku s kůží okamžitě omyjte velkým množstvím vody.

S 45 – V případě nehody, nebo necítíte-li se dobře, okamžitě vyhledejte lékařskou pomoc (je-li možno, ukažte toto označení).

Všechny jednotky séra a plazmy, použité k výrobě složek dodaných v této soupravě, byly testovány na HBsAg, protilátky proti HCV a protilátky proti HIV-1/2 a bylo zjištěno, že jsou nereaktivní. Protože však žádná testovací metoda nemůže poskytnout absolutní jistotu nepřítomnosti patogenů, všechny vzorky lidského původu se musí považovat za potenciálně infekční a musí se s nimi nakládat opatrně.

## 12. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- V laboratoři, kde probíhá stanovení, nejezte, nepijte, nekuřte ani nenanášejte kosmetické prostředky.
- Nepipetujte roztoky ústy.
- Používáním ochranných oděvů a pomůcek, jako jsou laboratorní pláště, ochranné brýle a rukavice na jedno použití, zabraňte kontaktu se všemi potenciálně infekčními materiály. Po dokončení každého stanovení si důkladně umyjte ruce.
- Zabraňte rozstříknutí nebo vytvoření aerosolu. Dojde-li k rozlití činidel, je nutné činidlo vždy opláchnout 5% roztokem chlornanu sodného a zlikvidovat je, jako by bylo potenciálně infekční.
- Všechny vzorky, biologická činidla a materiály použité během stanovení musejí být považovány za materiál, který může potenciálně přenášet infekční agens. Proto je nutné likvidovat je v souladu s platnými předpisy a pokyny orgánů, do jejichž působnosti laboratoř spadá, a právními předpisy příslušné země. Materiál na jedno použití musí být spálen; tekutý odpad musí být dekontaminován pomocí chlornanu sodného v konečné koncentraci 5 %, a to nejméně po dobu půl hodiny. Veškerý materiál určený pro opakované použití musí být sterilizován v autoklávu *při vyšších parametrech, než jsou nutné pro plnou sterilizaci* (USP 24, 2000, str. 2143). Za postačující se obvykle považuje sterilizace po dobu 1 hodiny při 121 °C, nicméně uživatelé musejí kontrolovat účinnost svého dekontaminačního cyklu tak, že provedou počáteční validaci a pravidelně budou používat biologické indikátory.

## 13. ZÁKLADNÍ PRAVIDLA RADIAČNÍ BEZPEČNOSTI

### Činidla obsahující jód 125

Tato souprava obsahuje radioaktivní materiál, jehož množství nepřevyšuje 8,12  $\mu\text{Ci}$  (300 kBq) jódu 125. Při skladování, manipulaci a likvidaci materiálu je nutné používat odpovídající bezpečnostní opatření a správnou laboratorní praxi.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci obecné licence:

Tento radioaktivní materiál mohou obdržet, nabývat, vlastnit a používat pouze lékaři, veterináři, kteří vykonávají veterinární praxi, klinické laboratoře nebo nemocnice, a to pouze pro účely klinických nebo laboratorních testů *in vitro*, při nichž není materiál ani záření, jež z něj vychází, aplikováno vnitřně ani vnějšně lidem ani zvířatům. Jeho obdržení, nabytí, držení, užívání a přeprava podléhá předpisům a obecné licenci Komise pro dohled nad jadernou bezpečností USA (U.S. Nuclear Regulatory Commission) nebo státu, s nímž komise uzavřela dohodu o výkonu regulační pravomoci.

1. Skladování radioaktivního materiálu musí být omezeno pouze na určený prostor.
2. Přístup k radioaktivnímu materiálu musí být omezen pouze na pracovníky s příslušným oprávněním.
3. Radioaktivní materiál nepipetujte ústy.
4. Při práci v prostorech určených k práci s radioaktivním materiálem nejezte ani nepijte.
5. V případě rozlití je nutné materiál setřít, potom omýt alkalickým detergentem nebo roztokem pro radiologickou dekontaminaci. Veškeré použité sklo se musí před mytím s jiným laboratorním sklem důkladně umýt vodou.

Pro lékaře a instituce přijímající radioizotopy v rámci specifické licence:

přijetí, použití, transport a likvidace radioaktivních materiálů podléhá předpisům a podmínkám konkrétní licence.

**POZOR:** Hodnoty radioaktivity uvedené na příbalové informaci se mohou mírně lišit od hodnot uvedených na štítku vnějšího obalu a na štítku lahvičky se značenou látkou. Štítek vnějšího obalu a lahvičky se značenou látkou označuje množství radioaktivity k datu kalibrace; příbalová informace označuje teoretickou radioaktivitu soupravy.

### SCHÉMA STANOVENÍ

- 1 - PŘIPRAVTE ČINIDLA. NAŘEĎTE VZORKY 1:51.
- 2 - OZNAČTE PARALELNÍ ZKUMAVKY S NANESENOU VRSTVOU.
- 3 - PODLE NÁSLEDUJÍCÍHO SCHÉMATU NADÁVKUJTE ČINIDLA A PROMÍCHEJTE INKUBAČNÍ SMĚS:

ČINIDLA \ ZKUMAVKY	T	KAL 0 - 5	NAŘEDĚNÉ VZORKY
KALIBRAČNÍ ROZTOKY	–	50 µl	–
NAŘEDĚNÉ VZORKY	–	–	50 µl
INKUBAČNÍ PUFŘ	–	500 µl	500 µl

- 4 - INKUBUJTE 2 HODINY PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ ZA SOUČASNÉHO TŘEPÁNÍ.
- 5 - ODSAJTE INKUBAČNÍ SMĚS A DVAKRÁT PROMYJTE 2 ml PROMÝVACÍHO PUFŘU.
- 6 - DO VŠECH ZKUMAVEK NADÁVKUJTE 500 µl ZNAČENÉ LÁTKY.
- 7 - INKUBUJTE 2 HODINY PŘI POKOJOVÉ TEPLOTĚ ZA SOUČASNÉHO TŘEPÁNÍ.
- 8 - ODSAJTE ZNAČENOU LÁTKU A DVAKRÁT PROMYJTE 2 ml PROMÝVACÍHO PUFŘU.
- 9 - ZMĚŘTE RADIOAKTIVITU ZKUMAVEK

**ΚΙΤ ΓΙΑ ΤΗ ΡΑΔΙΟΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗ  
ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ ΑΝΤΙ- ΘΥΡΕΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ**

**Μέθοδος για την ποσοτική ανάλυση των  
αυτοαντισωμάτων ανθρώπινης αντι-θυρεοσφαιρίνης (IgG anti-hTg)  
σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος**

**Μόνο για χρήση in vitro**

**1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

Οι αυτοάνοσοι του θυρεοειδούς περιλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα παθήσεων όπως ο υποθυρεοειδισμός (θυρεοειδίτιδα του Hashimoto) ο υπερθυρεοειδισμός (ασθένεια του Graves-Basedow), ή άλλες υποκλινικές παθήσεις σε ασυμπτωματικά άτομα, ευθυρεοειδικά ή υποθυρεοειδικά, από βιοχημικής πλευράς. Η σχέση ανάμεσα σε αυτά τα άκρα αντιπροσωπείται από την παρουσία κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων κατευθυνόμενων ενάντια σε θυρεοειδικά αντιγόνα.

Για την αυτοάνοσο θυρεοειδίτιδα έχουν περιγραφεί τρία ξεχωριστά συστήματα αντιγόνο- αντίσωμα που βρίσκονται κανονικά στο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό – και που εμπλέκουν αντιστοίχως hTg, ένα κολλοειδές αντιγόνο και ένα μικροσωμικό (θυρεοειδική υπεροξειδάση).

Η έρευνα των αυτοαντισωμάτων anti-hTg, που ανήκουν κυρίως στην κλάση IgG (IgG anti-hTg), είναι κλινικά πολύ χρήσιμη για τη διάγνωση των αυτοάνοσων θυρεοειδικών παθήσεων όπως η ασθένεια του Graves-Basedow, η θυρεοειδίτιδα του Hashimoto και το πρωτοπαθές μυξοίδημα.

Το επίπεδο των IgG anti-hTg δεν σχετίζεται με τις συγκεντρώσεις T<sub>3</sub> ή T<sub>4</sub>. Πράγματι αυτά τα αντισώματα μπορούν να βρεθούν σε ευθυρεοειδικά ή υπο- ή υπερθυρεοειδικά άτομα.

Οι αυτοάνοσες ασθένειες του θυρεοειδούς είναι πιο συχνές στις γυναίκες, στις οποίες η παρουσία των αυτοαντισωμάτων αυξάνει με την ηλικία, ξεκινώντας με έναν επιπολασμό περίπου 10% γύρω στην ηλικία των 20 ετών, μέχρι το 30% πέραν των εξήντα ετών. Αυτά τα επίπεδα των αντισωμάτων μπορούν να προκαλέσουν χρόνια θυρεοειδίτιδα με επακόλουθο υποθυρεοειδισμό.

Στο πρωτοπαθές μυξοίδημα παρατηρούνται σημαντικά επίπεδα αυτοαντισωμάτων τα οποία είναι χαρακτηριστικά στα τελικά στάδια αυτοάνοσης χρόνιας ατροφικής θυρεοειδίτιδας. Στα νεότερα άτομα η εύρεση βρογχοκοιλής και υψηλών επιπέδων αυτοαντισωμάτων δείχνει γενικά θυρεοειδίτιδα του Hashimoto, η οποία χαρακτηρίζεται από μια προοδευτική μείωση της θυρεοειδικής λειτουργικότητας με επακόλουθο υποθυρεοειδισμό. Στην ασθένεια του Graves-Basedow, η τοξική βρογχοκοίλη σχετίζεται με χρόνια θυρεοειδίτιδα, με παρουσία υψηλών επιπέδων κυκλοφορούντων αυτοαντισωμάτων.

Σε όλες τις περιπτώσεις η παρακολούθηση των επιπέδων των αυτοαντισωμάτων είναι χρήσιμη για την επίβλεψη της θεραπείας και για την αναγνώριση του κινδύνου εξέλιξης μιας αυτονόσου στους συγγενείς των ασθενών.

**2. ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ**

Η χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι ραδιοανοσολογικού τύπου (IRMA). Στην πρώτη φάση οι IgG anti-hTg που εμπεριέχονται στους βαθμονομητές ή στα δείγματα δημιουργούν δεσμό με την hTg που προσροφείται σε στερά φάση. Στη δεύτερη φάση η πρωτεΐνη A ιχνηθετημένη με <sup>125</sup>I (ιχνηθέτης <sup>125</sup>I) επιπρόσθετο δημιουργεί δεσμό με το σύμπλοκο IgG- hTg σε στερά φάση. Έπειτα από τις δύο επώσεις, η ποσότητα της ιχνηθετημένης και συνδεδεμένης στη στερά φάση πρωτεΐνης A είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της IgG anti-hTg που υπάρχει στους βαθμονομητές ή στα δείγματα. Στο τέλος καθεμίας επώασης το υλικό που δεν έχει δημιουργήσει δεσμό αποβάλλεται μέσω αναρρόφησης και πλύσης. Η μέθοδος που υιοθετείται για το διαχωρισμό ελεύθερης/συνδεδεμένης βασίζεται στη χρήση των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωληνίων, όπου η hTg έχει δεσμευθεί στα τοιχώματα των δοκιμαστικών σωληνίων.

Η δοσομέτρηση των αντισωμάτων anti-hTg χρησιμοποιεί σαν ιχνηθέτη την πρωτεΐνη A, μια πρωτεΐνη του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου *Staphylococcus aureus* που έχει τη δυνατότητα να συνδέεται με το απόσπασμα Fc των μορίων των IgG.

**3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΠΟΥ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ ΣΤΟ ΚΙΤ**

Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες	100
Ιχνηθέτης <sup>125</sup> I	1 φιαλίδιο
Βαθμονομητές anti-hTg	6 φιαλίδια
Ορός ελέγχου	1 φιαλίδιο
Διαλύτης δειγμάτων	2 φιαλίδια
Ρυθμιστικό επώασης	1 φιαλίδιο
Ρυθμιστικό πλύσης	2 φιαλίδια
Αριθμός δοσομετρήσεων	100

**ΤΡΟΠΟΣ ΣΥΝΤΗΡΗΣΗΣ:** Κατά τη στιγμή της άφιξης, διατηρήστε τα κιτ στους 2-8°C Μην καταψύχετε. Έπειτα από το άνοιγμα, τα αντιδραστήρια αυτού του κιτ είναι σταθερά μέχρι την ημερομηνία λήξεως εάν διατηρηθούν καταλλήλως. Το κιτ είναι εγγυημένο για 4 σειρές ανάλυσης εάν χρησιμοποιηθεί κατά τη διάρκεια της ημέρας σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και εάν διατηρείται στους 2-8°C κατά τη διάρκεια της νύκτας.

Μη χρησιμοποιείτε τα αντιδραστήρια πέραν της ημερομηνίας λήξεως. Η ημερομηνία λήξεως του kit φαίνεται στην εξωτερική ετικέτα και ανταποκρίνεται στην ημερομηνία λήξεως του ιχνηθέτη. Η ημερομηνία λήξεως καθενός συστατικού φέρεται στις ετικέτες των αντίστοιχων φιαλιδίων.

Κατά την ανασύσταση των φιαλιδίων, ανακινήστε απαλά ώστε να αποφύγετε τη δημιουργία αφρού.

Μην αναμιγνύετε αντιδραστήρια που προέρχονται από διαφορετικές παρτίδες.

### 3.1. Ευαισθητοποιημένοι δοκιμαστικοί σωλήνες

Η εσωτερική επιφάνεια κάθε δοκιμαστικού σωλήνα έχει επενδυθεί με υψηλά κεκαθαρμένη βιοθυνλιωμένη hTg. Τη στιγμή της χρήσης, φέρατε τους ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος πριν να ανοίξετε το δοχείο, ώστε να αποφύγετε συμπύκνωση της υγρασίας. Οι αχρησιμοποίητοι δοκιμαστικοί σωλήνες πρέπει να διατηρούνται στο καλά κλειστό δοχείο. Μην αναμιγνύετε διαφορετικές παρτίδες ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων.

### 3.2. Ιχνηθέτης <sup>125</sup>I (κόκκινο): αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 52 mL πρωτεΐνης A ιχνηθετημένης με <sup>125</sup>I, βόεια αλβουμίνη ορού, φωσφορικό-κιτρικό ρυθμιστικό, συντηρητικά και μια αδρανή κόκκινη χρωστική. Η μέγιστη ραδιενέργεια είναι 296 kBq (8 μCi) ανά φιαλίδιο κατά την ημερομηνία της βαθμονόμησης.

### 3.3. Βαθμονομητές αντι-θυρεοσφαιρίνης: αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Κάθε φιαλίδιο περιέχει 0,5 mL προαραιωμένου ανθρώπινου ορού που περιέχουν IgG anti-hTg, βόειο ορό, βόεια αλβουμίνη ορού, ρυθμιστικό PBS και συντηρητικά. Οι συγκεντρώσεις των βαθμονομητών είναι οι ακόλουθες: 0 - 100 - 200 - 500 - 1500 - 6500 IU/mL. Οι βαθμονομητές του kit έχουν βαθμονομηθεί έναντι του Διεθνούς Standard MRC 65/93. Οι βαθμονομητές του kit εναλλάσσονται με τα δείγματα υπό εξέταση όταν χρησιμοποιούνται με τα αντιδραστήρια και την επιχειρησιακή διαδικασία του αντίστοιχου διαγνωστικού τεστ *in vitro*, σύμφωνα με όσα συνιστώνται από τον κατασκευαστή.

Από τη στιγμή που οι βαθμονομητές έχουν προαραιωθεί σε αναλογία 1:51 και έχουν προσδιοριστεί οι αντίστοιχες τιμές, η συγκέντρωση των δειγμάτων σε IU/mL μπορεί να υπολογιστεί απευθείας μέσω παρεμβολής από την καμπύλη βαθμονόμησης. Χρειάζεται να εισάγετε έναν συντελεστή πολλαπλασιασμού μόνο εάν η αραιώση του δείγματος είναι ανώτερη του 1:51.

### 3.4. Ορός ελέγχου: λυόφιλο αντιδραστήριο

Το φιαλίδιο περιέχει προαραιωμένο ανθρώπινο ορό, αντισώματα αντι-θυρεοσφαιρίνης, βόειο ορό, βόεια αλβουμίνη ορού, ρυθμιστικό PBS και συντηρητικά. Το εύρος των συγκεντρώσεων κάθε ελέγχου αναφέρεται στο πιστοποιητικό ανάλυσης και δείχνει τα όρια που έχουν καθοριστεί από την DiaSorin για τιμές ελέγχων που μπορούν να επιτευχθούν σε αξιόπιστους κύκλους εξετάσεων.

Πραγματοποιήστε ανασύσταση του περιεχομένου του φιαλιδίου με 1 mL απεσταγμένου νερού. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό στους 2-8°C μέχρι την ημερομηνία λήξεως. Συνιστάται να μην αραιώνετε περαιτέρω τον ορό ελέγχου. Διαβάστε απευθείας την τιμή από την καμπύλη βαθμονόμησης.

### 3.5. Διαλύτης δειγμάτων: αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Κάθε φιαλίδιο περιέχει 50 mL ρυθμιστικού PBS, βόειο ορό, βόεια αλβουμίνη ορού και συντηρητικά.

Το αντιδραστήριο είναι κοινό στα kit AB-TPOK-3 και AB-HTGK-3.

### 3.6. Ρυθμιστικό επώασης (μπλε): αντιδραστήριο έτοιμο προς χρήση

Το φιαλίδιο περιέχει 52 mL ενός ρυθμιστικού διαλύματος TRIS, βόεια αλβουμίνη ορού, καθαριστικά, συντηρητικά και μια αδρανή μπλε χρωστική.

### 3.7. Ρυθμιστικό πλύσης: αντιδραστήριο σε διάλυμα (10x)

Κάθε φιαλίδιο περιέχει 50 mL Triton X-100 στο 0,5% και φυσιολογικό διάλυμα αλάτων. Φέρατε σε όγκο 500 mL με αποϊονισμένο νερό ολόκληρο το περιεχόμενο κάθε φιαλιδίου. Το διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερό στους 2-8°C μέχρι την ημερομηνία λήξεως του kit. Το διάλυμα χρησιμοποιείται για την πλύση των δοκιμαστικών σωλήνων.

## 4. ΒΟΗΘΗΤΙΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- Απεσταγμένο και αποϊονισμένο νερό.
- Γυάλινα είδη εργαστηρίου.
- Πλαστικοί δοκιμαστικοί σωλήνες μίας χρήσεως.
- Μικρομετρικές σύριγγες με άκρα μίας χρήσεως των 10, 50 μL (ακρίβεια ± 3%, επαναληπτικότητα 2%) και 500, 1000 μL (ακρίβεια ± 2%, επαναληπτικότητα 1%).
- Έδρανα δοκιμαστικών σωλήνων.
- Αναδευτήρας Vortex.
- Περιστροφικός αναδευτήρας με ταχύτητα ανάδευσης 300-350 rpm.
- Σύστημα για τη διανομή και την αναρρόφηση του ρυθμιστικού πλύσης σε θέση να διανέμει 2-3 mL ανά κύκλο πλύσης κατά τη διάρκεια δύο κύκλων πλύσης.
- Μετρητής γάμμα για τη μέτρηση του Ιωδίου 125I (ρύθμιση παραμέτρων του παραθύρου του μετρητή: 15-80 keV).
- απόδοση του μετρητή: 70% - χρόνος μέτρησης: 1 min). Εάν η απόδοση του μετρητή είναι κατώτερη του 60%, πρέπει να παραταθεί ο χρόνος μέτρησης σε 2 min.

## 5. ΕΞΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Η δοσομέτρηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε δείγματα ανθρώπινου ορού ή πλάσματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν αντιπηκτικά όπως το κιτρικό, EDTA και ηπαρίνη. Πραγματοποιήστε την αιμοληψία από φλέβα, αφήστε το αίμα να πήξει και διαχωρήστε τον ορό από το θρόμβο το συντομότερο δυνατόν. Καθαρίστε με φιλτράρισμα ή φυγοκέντριση πριν από το τεστ τα δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση, λευκαύγεια, λιπαιμία ή ερυθροκυτταρικά υπόλοιπα. Μη χρησιμοποιείτε δείγματα που έχουν υποστεί ισχυρή αιμόλυση ή λιπαιμικά, ούτε επίσης και δείγματα που παρουσιάζουν υλικό σε αιώρηση ή προφανή μόλυση από μικρόβια. Εάν η δοσομέτρηση έχει εκτελεσθεί στις επόμενες 24 ώρες από την αιμοληψία, τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους 2-8°C. Σε αντίθετη περίπτωση, πρέπει να διαιρεθούν σε κατεψυγμένα κλάσματα στους -20°C ή σε κατώτερες θερμοκρασίες. Εάν τα δείγματα έχουν κατεψυχθεί, ανακινήστε με προσοχή πριν να τα δοσομετρήσετε. Αποφεύγετε επαναλαμβανόμενους κύκλους ψύξης και απόψυξης.

### Αραίωση των δειγμάτων

Τα δείγματα πρέπει να είναι αραιωμένα με αναλογία 1:51 με το διαλύτη δειγμάτων (3.5) πριν από τη δοσομέτρηση. Διανήμετε 10 µL δείγματος και 500 µL διαλύτη δειγμάτων σε πλαστικούς δοκιμαστικούς σωλήνες και αναδεύστε σε Vortex.

Εάν προβλέπονται υψηλές συγκεντρώσεις IgG anti-hTg, αραιώστε επιπλέον με το διαλύτη δειγμάτων. Οι βαθμονομητές και ο ορός ελέγχου είναι έτοιμοι προς χρήση και δεν πρέπει να αραιωθούν.

## 6. ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ

Φέρατε τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (20-25°C) πριν από τη δοσομέτρηση. Προβλέπετε τους προσδιορισμούς τουλάχιστον διπλά. Εκτελέστε τον προσδιορισμό των βαθμονομητών για κάθε σειρά αναλυμένων δειγμάτων. Η επιχειρησιακή μέθοδος πρέπει να είναι αυστηρά όμοια για τους βαθμονομητές και για τα δείγματα υπό εξέταση.

Εκτελέστε τις φάσεις της δοσομέτρησης με την προβλεπόμενη σειρά, χωρίς διακοπές. Χρησιμοποιήστε μια νέα άκρη μίας χρήσεως για να απαλλάξετε τους βαθμονομητές και τα δείγματα.

- Διανήμετε τα αντιδραστήρια στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Ενεργήστε σύμφωνα με το ακόλουθο σχεδιάγραμμα:

δοκιμαστικοί σωλήνες	Βαθμονομητές 0-5	Δείγματα αραιωμένα
αντιδραστήρια		
Βαθμονομητές	50 µL	—
Αραιωμένα δείγματα	—	50 µL
Ρυθμιστικό επώασης	500 µL	500 µL

- **Ανακινήστε** το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων και **αφήστε για επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος** υπό ανάδευση (300-350 rpm).
- **Αναρροφήστε** επιμελώς το μίγμα επώασης και **πλύνετε** δύο φορές με 2 mL ρυθμιστικού πλύσης. *Βεβαιωθείτε ότι η αποβολή του υγρού είναι πλήρης, όντας σίγουροι ότι η άκρη της μικροσύριγγας αναρρόφησης ακουμπά στον πυθμένα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων. Η παρουσία σταγόνων που εφάπτονται στα τοιχώματα των ευαισθητοποιημένων δοκιμαστικών σωλήνων μπορεί να προκαλέσει μειωμένη αναπαραγωγιμότητα ή μη έμπιστα αποτελέσματα. Δεν πρέπει να μείνει ίχνος της χρωστικής.*
- **Διαμήμετε 500 µL ιχνηθέτη** σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες. Προετοιμάστε δύο μη ευαισθητοποιημένους δοκιμαστικούς σωλήνες για τον υπολογισμό της ολικής δραστηριότητας που να περιέχουν μόνο 500 µL ιχνηθέτη και αφήστε τους στην άκρη μέχρι τη στιγμή της μέτρησης.
- **Αφήστε για επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία περιβάλλοντος** υπό ανάδευση (300-350 rpm).
- **Αναρροφήστε** επιμελώς τον ιχνηθέτη και **πλύνετε** δύο φορές με 2 mL ρυθμιστικού πλύσης. Ενεργήστε όπως επάνω.
- **Μετρήστε τη ραδιενέργεια** των δοκιμαστικών σωλήνων.

## 7. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Υπολογίστε το μέσο όρο των μετρήσεων για κάθε ομάδα δοκιμαστικών σωλήνων, αφού έχετε αφαιρέσει την τιμή του ιζήματος. Εκφράστε το μέσο όρο των μετρήσεων βαθμονομητών και δειγμάτων ως εκατοστιαίο σε σχέση με την ολική δραστηριότητα:

$$B/T\% = \frac{\text{μέση μέτρηση βαθμονομητών και δειγμάτων}}{\text{μέση μέτρηση ολικής δραστηριότητας}} \times 100$$

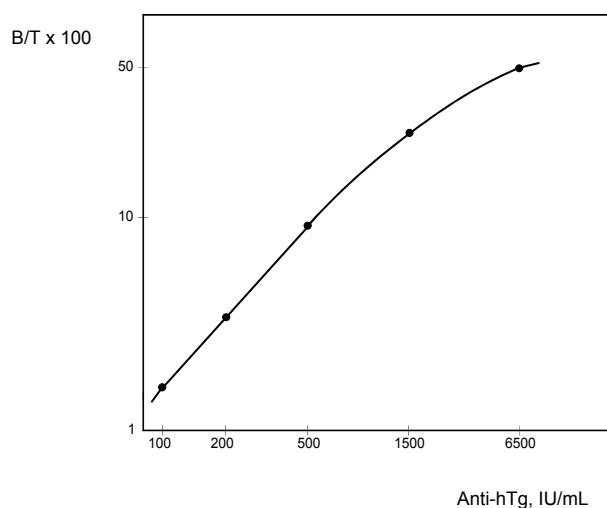
Φέρατε σε γραφικό διάγραμμα log-log τον εκατοστιαίο μέσο όρο που υπολογίστηκε για κάθε βαθμονομητή στον άξονα των τεταγμένων (άξονας των Y) σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση IgG anti-hTg εκφρασμένη σε IU/mL στο άξονα των τετημένων (άξονας των X). Επιτυγχάνεται έτσι μια καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 1). Απευθείας από την καμπύλη βαθμονόμησης διαβάστε τη συγκέντρωση των IgG anti-hTg κάθε ενός δείγματος εκφρασμένη σε IU/mL. Εάν το δείγμα έχει αραιωθεί πέραν του αρχικού συντελεστή 1:51, η συγκέντρωση IgG anti-hTg που θα βρεθεί πρέπει να πολλαπλασιαστεί με το συντελεστή αραίωσης ανώτερο από 1:51, έχοντας υπ'όψην ότι οι βαθμονομητές είναι ήδη προαραιωμένοι 1:51.

### Παράδειγμα υπολογισμού

Τα ακόλουθα στοιχεία πρέπει να θεωρηθούν μόνο ένα παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιηθούν ανάμεσα στα στοιχεία που θα προκύψουν στο χρήστη.

Περιγραφή	cpm	B/T x 100
Ολική δραστηριότητα	78.581	–
Βαθμονομητής μηδέν/αραιωτής δειγμάτων	85	–
100 IU/mL	1.313	1,6
200 IU/mL	2.663	3,3
500 IU/mL	6.445	8,2
1500 IU/mL	19.955	25,3
6500 IU/mL	40.869	52,0
Δείγμα	2.977	3,7

Παρεμβάλλοντας από την καμπύλη βαθμονόμησης, το δείγμα προκύπτει να περιέχει 230 IU/mL IgG anti-hTg.



Εικόνα 1

### Ερμηνεία των αποτελεσμάτων

Ο πρώτος βαθμονομητής (100 IU/mL) αντιπροσωπεύει το cut-off του συστήματος.

Θεωρούνται θετικά για παρουσία IgG anti-hTg τα δείγματα με τιμή ίση ή ανώτερη του cut-off. Τα δείγματα με τιμή κατώτερη από το cut-off πρέπει να θεωρούνται αρνητικά.

Παρόλα αυτά, συνιστάται να θεωρούνται ύποπτα τα δείγματα με τιμές IgG anti-hTg εντός του  $\pm 20\%$  του cut-off.

Συνιστούμε σε κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει τα δικά του διαστήματα αναφοράς.

### 8. ΚΛΙΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Κατά τη διάρκεια των κλινικών μελετών ελήφθησαν υπόψη 211 άτομα. Σε αυτόν τον πληθυσμό τα άτομα ταξινομήθηκαν ως αρνητικά, θετικά και ύποπτα με ένα τεστ αναφοράς.

Με το kit DiaSorin το 96% των ατόμων που ταξινομήθηκαν ως αρνητικά παρουσιάζει τιμές IgG anti-hTg κατώτερες από 100 IU/mL και το 100% των ατόμων που ταξινομήθηκαν ως θετικά παρουσιάζει τιμές IgG anti-hTg ανώτερες από 100 IU/mL.

Παρόλα αυτά οι τιμές που αναφέρονται παραπάνω είναι μονάχα ενδεικτικές. Συνιστούμε σε κάθε εργαστήριο να προσδιορίσει τα δικά του διαστήματα αναφοράς.



## 9. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΠΙΔΟΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΙΤ

### 9.1. Ειδικότητα ανάλυσης

Η αναλυτική ειδικότητα ορίζεται σαν η ικανότητα του τεστ να ανιχνεύει ακριβώς τον αναλύτη παρουσία παραγόντων δυνητικά παρεμβαλλόντων στο στέλεχος του δείγματος (για παράδειγμα, αντιπηκτικά, αιμόλυση, αποτελέσματα της επεξεργασίας του δείγματος) ή διασταυρούμενες αντιδράσεις με αναλύτες δυνητικώς παρεμβαλλόντες.

**Παρεμβολές.** Μελέτες που έχουν ελεγχθεί σχετικά με παράγοντες δυνητικώς παρεμβαλλόντες, έχουν αποδείξει το ότι οι επιδόσεις του τεστ δεν επηρεάζονται από αντιπηκτικά (EDTA, ηπαρίνη, κιτρικό), ελαφρά αιμόλυση (μέχρι 20 mg/dL αιμοσφαιρίνης), λιπαιμία (μέχρι 10000 mg/dL τριγλ υκ ερ ίδια), χολερυθριναιμία (μέχρι 50 mg/dL χολερυθρίνη).

**Διασταυρούμενες αντιδράσεις.** Η χρήση hTg ακραίως κεκαθαρμένης για την ευαισθητοποίηση των δοκιμαστικών σωλήνων μειώνει τη δυνατότητα παρεμβολών που οφείλονται σε μη ειδικές πρωτεΐνες.

Δεν έχουν παρατηρηθεί διασταυρούμενες αντιδράσεις που να οφείλονται στην παρουσία αυτοαντισωμάτων anti-TPO μέχρι μια συγκέντρωση 1000 U/mL.

### 9.2. Ευαισθησία ανάλυσης

Η αναλυτική ευαισθησία μπορεί να εκφρασθεί επίσης σαν όριο ανίχνευσης, ή η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που είναι ανιχνεύσιμη από το τεστ. Το όριο ανίχνευσης είναι 6 IU/mL στο 95% εμπιστοσύνης. Έχει υπολογισθεί σαν η φαινομενική συγκέντρωση του αναλύτη που διακρίνεται από τον βαθμονομητή μηδέν (αραιωτή δειγμάτων), ή δύο τυπικές αποκλίσεις πάνω από το μηδέν.

### 9.3. Επαναληπτικότητα

Η επαναληπτικότητα και η αναπαραγωγιμότητα του δείγματος (ή αλλιώς η δια-δειγματική και ενδο-δειγματική μεταβλητότητα) έχουν καθοριστεί χρησιμοποιώντας δείγματα υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις αναλύτη.

Επαναληπτικότητα	A	B	C
Αριθμός καθορισμών	10	10	10
Μέσος όρος (IU/mL)	115	951	2924
Τυπική απόκλιση	3,3	42,7	105,0
Βαθμός μεταβολής (%)	2,9	4,4	3,6

Αναπαραγωγιμότητα	A	D	E
Αριθμός καθορισμών	10	10	10
Μέσος όρος (IU/mL)	119	793	2361
Τυπική απόκλιση	13,9	53,0	177,0
Βαθμός μεταβολής (%)	11,6	6,7	7,5

### 9.4. Ακρίβεια

Η ακρίβεια της δοσομέτρησης έχει ελεγχθεί μέσω τεστ αραιώσεως.

**Τεστ αραιώσεως.** Έχουν δοσομετρηθεί μονόμετρες αραιώσεις δύο ορών σε υψηλή συγκέντρωση IgG anti-hTg πραγματοποιημένες στον αραιωτή δειγμάτων.

Αραίωση	Συγκέντρωση αναμενόμενη, IU/mL	Συγκέντρωση μετρημένη, IU/mL	% Ανάκτηση
άθικτο	–	3089,00	–
1:2	1544,50	1640,00	106,2
1:4	772,30	776,70	100,6
1:8	386,10	381,80	98,9
1:16	193,10	204,50	105,9
1:32	96,50	107,60	111,5
άθικτο	–	2457,00	–
1:2	1228,50	1246,50	101,5
1:4	614,25	609,40	99,2
1:8	307,13	321,80	104,8
1:16	153,56	157,50	102,6

### 9.5. Αποτέλεσμα κορεσμού σε υψηλές δόσεις

Όταν δοσομετρούνται δείγματα που περιέχουν εξαιρετικά υψηλές συγκεντρώσεις αντισωμάτων σε μια μέθοδο *sandwich* με δύο επώασεις, είναι δυνατόν να επιτευχθούν φαινομενικά κατώτερα επίπεδα αντισώματος από το πραγματικό ως αποτέλεσμα του κορεσμού. Ένα καλά τελειοποιημένο σύστημα αποκλείει όμως το να επιτυγχάνονται αποτελέσματα χονδροειδώς υποτιμημένα (όπως μπορεί να συμβεί στις δοσομετρήσεις *sandwich* με μία επώαση).

Έχουν δοσομετρηθεί συγκεντρώσεις IgG anti-hTg μέχρι 100 χιλιάδες IU/mL και έχει παρατηρηθεί ότι αυτές οι συγκεντρώσεις δημιουργούν ένα αναλυτικό σήμα πάντα ανώτερο από τον βαθμονομητή με τη μεγαλύτερη συκέντρωση (καμπύλη κορεσμού). Για μια σωστή ποσοτική ανάλυση, τα δείγματα που περιέχουν επίπεδα IgG anti-hTg ανώτερα από εκείνο του βαθμονομητή με τη μεγαλύτερη συκέντρωση, πρέπει να αραιώνονται με τον αραιωτή δειγμάτων και να επαναδοσομετρούνται. Τα αποτελέσματα κατόπιν πρέπει να πολλαπλασιάζονται με το συντελεστή αραιώσης ανώτερο από 1:51 ώστε να επιτευχθούν τα επίπεδα IgG anti-hTg των μη αραιωμένων δειγμάτων.

### 10. ΟΡΙΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

Η χρήση της ραδιοανοσολογικής δοσομέτρησης έχει μειώσει δραστικά τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Παρ'όλα αυτά, η διάγνωση δεν θα πρέπει να διατυπώνεται με βάση το αποτέλεσμα μιας και μόνο δοσομέτρησης, αλλά αυτό θα πρέπει να αξιολογείται μαζί με άλλα κλινικά ευρήματα, διαγνωστικές διαδικασίες και υπό την κρίση του ιατρού.

Βακτηριακή μόλυνση ή επαναλαμβανόμενοι κύκλοι ψύξης/απόψυξης των δειγμάτων μπορούν να μετατρέψουν τα αποτελέσματα της δοσομέτρησης.

Για να επιτευχθούν αξιόπιστα αποτελέσματα χρειάζεται να ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες χρήσεως και να κατέχεται μια κατάλληλη τεχνική χειρογνοσία. Ειδικότερα, είναι σημαντική μια καλή ακρίβεια στις φάσεις ανασύστασης και διανομής των αντιδραστηρίων και σε εκείνες της αναρρόφησης και πλύσης.

Αποτελέσματα που δεν επαναλαμβάνονται οφείλονται κυρίως σε μεθοδολογικούς παράγοντες όπως για παράδειγμα:

- εναλλαγή στις κάψουλες ανάμεσα στα φιαλίδια
- χρήση του ίδιου άκρου μικροσύριγγας για τις αναλήψεις από διαφορετικά φιαλίδια ή από διαφορετικά δείγματα.
- φιαλίδια που έχουν αφεθεί ανοικτά για μακρές χρονικές περιόδους
- έκθεση των αντιδραστηρίων ή των δειγμάτων σε έντονη θερμότητα, ή σε ισχυρές πηγές βακτηριακής μόλυνσης.
- ακατάλληλη αναρρόφηση του μίγματος επώασης και πλύση των δοκιμαστικών σωλήνων
- μόλυνση του άκρου των δοκιμαστικών σωλήνων με τον ιχνηθέτη ή με τα δείγματα
- τυχαίες διακυμάνσεις ή κακή συντήρηση του μετρητή γάμμα
- εναλλαγή των αντιδραστηρίων από διαφορετικές παρτίδες.

### 11. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ

Τα συστατικά του kit περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό. Από τη στιγμή που το αζίδιο του νατρίου μπορεί να δημιουργήσει αζίδια μολύβδου ή χαλκού στις σωληνώσεις, συνιστάται να αφήσετε να τρέξει άφθονο νερό στις αποχετεύσεις έπειτα από την αποβολή διαλυμάτων που περιέχουν αζίδιο του νατρίου (Council Directive 99/45/EC).

R 22 – Επιβλαβές κατά την κατάποση.

R 31 – Σε επαφή με οξέα ελευθερώνονται τοξικά αέρια.

S 28 – Σε περίπτωση επαφής με το δέρμα, πλυθείτε αμέσως με άφθονο νερό.

S 45 – Σε περίπτωση ατυχήματος ή αν αισθανθείτε αδιαθεσία ζητήστε αμέσως αμέσως ιατρική συμβουλή (δείτε την ετικέτα αν είναι δυνατό).

Όλες οι μονάδες ορού και πλάσματος που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των συστατικών αυτού του kit έχουν αναλυθεί και έχει βρεθεί ότι δεν έχουν καμία αντιδραστικότητα με HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 και anti-HIV-2. Παρ'όλα αυτά δεδομένου του ότι καμία μέθοδος δεν μπορεί να δώσει απόλυτη σιγουριά για το ότι απουσιάζουν παθογόνοι παράγοντες, όλο το υλικό ανθρώπινης προέλευσης θα πρέπει να θεωρείται ως δυνητικώς μολυσματικό και επομένως θα πρέπει να τυχαίνει κατάλληλης μεταχείρισης.

### 12. ΚΑΝΟΝΕΣ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ

- Μην τρώτε, πίνετε, καπνίζετε ή χρησιμοποιείτε καλλυντικά κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης της δοσομέτρησης.
- Μην πραγματοποιείτε αναρρόφηση με το στόμα.
- Αποφεύγετε την άμεση επαφή με τα υλικά που ενδεχομένως να είναι μολυσμένα, φορώντας κατάλληλη ένδυση εργαστηρίου, προστατευτικά γυαλιά και γάντια μίας χρήσεως. Πλένετε προσεκτικά τα χέρια στο τέλος της δοσομέτρησης.
- Αποφεύγετε να προκαλείτε πιτσιλίσματα ή αεροζόλ. Κάθε σταγόνα βιολογικού αντιδραστηρίου πρέπει να αποβάλλεται με ένα διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 5% και το χρησιμοποιούμενο μέσο θα πρέπει να τυγχάνει μεταχείρισης κατάλληλης για μολυσμένα απόβλητα.

- Όλα τα δείγματα, όλα τα βιολογικά αντιδραστήρια του κιτ και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση της δοσομέτρησης θα πρέπει να θεωρούνται ικανά να μεταδώσουν μολυσματικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό τα απόβλητα πρέπει να διατεθούν σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις και τους ισχύοντες κανονισμούς κάθε Κράτους. Τα υλικά μίας χρήσεως θα πρέπει να αποτεφρώνονται. Τα υγρά απόβλητα θα πρέπει να απολυμαίνονται με υποχλωριώδες νάτριο σε μία τελική συγκέντρωση της τάξεως του 5% για τουλάχιστον μισή ώρα. Οποιοδήποτε υλικό που πρέπει να επαναχρησιμοποιηθεί θα πρέπει να τίθεται σε κλίβανο με μια προσέγγιση *overkill* (USP 24, 2000, p. 2143). Γενικά θεωρείται ότι μία ώρα στους 121°C είναι ένας επαρκής χρόνος αποστείρωσης. Παρ'όλα αυτά συνιστούμε σε κάθε χρήστη να επιβεβαιώνεται σχετικά με την αποτελεσματικότητα του κύκλου απολύμανσης μέσω μιας αρχικής επικύρωσης και την χρήση,σε βάση ρουτίνας, βιολογικών δεικτών.

### 13. ΒΑΣΙΚΟΙ ΚΑΝΟΝΕΣ ΡΑΔΙΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ

#### Αντιδραστήρια που περιέχουν ιώδιο 125

Το κιτ αυτό περιέχει ραδιενεργό υλικό το οποίο δεν υπερβαίνει τα 8,12 μCi (300 kBq) σε ιώδιο 125. Κατά τη φύλαξη, το χειρισμό και τη διάθεση του υλικού αυτού, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται κατάλληλες προφυλάξεις και καλές εργαστηριακές πρακτικές.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από γενική άδεια:

Το παρόν ραδιενεργό υλικό μπορεί να ληφθεί, να αποκτηθεί, να κατέχεται και να χρησιμοποιείται μόνο από ιατρούς, κτηνίατρος που εξασκούν κτηνιατρική ιατρική, κλινικά εργαστήρια ή νοσοκομεία και μόνο για κλινικές ή εργαστηριακές δοκιμές *in vitro* που δεν περιλαμβάνουν την εσωτερική ή εξωτερική χορήγηση του υλικού, ή της ακτινοβολίας αυτού, σε ανθρώπους και ζώα. Η παραλαβή, η απόκτηση, η κατοχή, η χρήση και η μεταφορά υπόκεινται στους κανονισμούς και τη γενική άδεια της Ρυθμιστικής Επιτροπής Πυρηνικών των Η.Π.Α. (NRC) της πολιτείας στην οποία η επιτροπή έχει συνάψει συμφωνία για την άσκηση καθηκόντων αρμόδιας αρχής.

1. Η φύλαξη του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να περιοριστεί σε ειδικά επισημασμένο χώρο.
2. Η πρόσβαση σε ραδιενεργά υλικά πρέπει να περιοριστεί μόνο σε εξουσιοδοτημένο προσωπικό.
3. Μη χρησιμοποιείτε πιπέτα με το στόμα σε ραδιενεργά διαλύματα.
4. Μην τρώτε ή πίνετε εντός των χώρων εργασίας που έχουν επισημανθεί ως ραδιενεργοί.
5. Οι περιοχές, όπου ενδεχομένως έχουν προκληθεί εκχύσεις, θα πρέπει να σκουπιστούν και κατόπιν να πλυθούν με αλκαλικό απορρυπαντικό ή ραδιολογικό απολυμαντικό διάλυμα. Τυχόν υάλινα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν πρέπει να εκπλυθούν καλά με νερό πριν από την πλύση άλλων εργαστηριακών υάλινων σκευών.

Προς ιατρούς ή ιδρύματα που παραλαμβάνουν ραδιοϊσότοπα κάτω από ειδική άδεια:

Η παραλαβή, η χρήση, η μεταφορά και η διάθεση των ραδιενεργών υλικών υπόκεινται στους κανονισμούς και τις συνθήκες της ειδικής άδειάς σας.

**ΠΡΟΣΟΧΗ:** Η ραδιενέργεια που αναγράφεται στο ένθετο συσκευασίας μπορεί να διαφέρει ελαφρώς από τη ραδιενέργεια που αναγράφεται στην ετικέτα συσκευασίας ή στην ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη. Η ετικέτα συσκευασίας και η ετικέτα φιαλιδίου ιχνηθέτη υποδεικνύουν την πραγματική ποσότητα ραδιενέργειας κατά την ημερομηνία βαθμονόμησης, ενώ το ένθετο συσκευασίας υποδεικνύει τη θεωρητική ραδιενέργεια του κιτ.

### ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΤΗΣ ΔΟΣΟΜΕΤΡΗΣΗΣ

- 1 - ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ. ΑΡΑΙΩΣΤΕ ΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ 1:51.
- 2 - ΣΗΜΕΙΩΣΤΕ ΔΙΠΛΑ ΤΟΥΣ ΕΥΑΙΣΘΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ.
- 3 - ΔΙΑΝΗΜΕΤΕ ΤΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΑΚΟΛΟΥΘΟ ΣΧΕΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΚΑΙ ΑΝΑΚΙΝΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ:

ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΙ ΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	T	CAL 0-5	ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΡΑΙΩΜΕΝΑ
ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΤΕΣ	—	50 $\mu$ L	—
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΣΕ ΔΙΑΛΥΜΑ	—	—	50 $\mu$ L
ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟ ΕΠΩΑΣΗΣ	—	500 $\mu$ L	500 $\mu$ L

- 4 - ΑΦΗΣΤΕ ΓΙΑ ΕΠΩΑΣΗ ΓΙΑ 2 ΩΡΕΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΥΠΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗ.
- 5 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΛΥΝΕΤΕ 2 ΦΟΡΕΣ ΜΕ 2 mL ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΠΛΥΣΗΣ.
- 6 - ΔΙΑΝΗΜΕΤΕ 500  $\mu$ L ΙΧΝΗΘΕΤΗ ΣΕ ΟΛΟΥΣ ΤΟΥΣ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΟΥΣ ΣΩΛΗΝΕΣ
- 7 - ΑΦΗΣΤΕ ΓΙΑ ΕΠΩΑΣΗ ΓΙΑ 2 ΩΡΕΣ ΣΕ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΥΠΟ ΑΝΑΔΕΥΣΗ.
- 8 - ΑΝΑΡΡΟΦΗΣΤΕ ΤΟ ΜΙΓΜΑ ΕΠΩΑΣΗΣ ΚΑΙ ΠΛΥΝΕΤΕ 2 ΦΟΡΕΣ ΜΕ 2 mL ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΟΥ ΠΛΥΣΗΣ.
- 9 - ΜΕΤΡΗΣΤΕ ΤΗ ΡΑΔΙΕΝΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΔΟΚΙΜΑΣΤΙΚΩΝ ΣΩΛΗΝΩΝ.

**REFERENCES/BIBLIOGRAFIA/BIBLOGRAPHIE/LITERATUR/BIBLIOGRAFÍA/REFERÊNCIAS/SEZNAM  
LITERURY/BIBΛIOΓΡΑΦΙΑ**

P.J. BANGA P.S. BARNETT, A.M. McGREGOR

Review – Immunological and molecular characterization of the thyroid peroxidase autoantigen, *Autoimmunity*, **8** : 335-343 (1991).

M.J. BAYER, J.P. KRISS

A solid phase, sandwich-type radioimmunoassay for antithyroglobulin: elimination of false positive results and semiquantitative measurement of antithyroglobulin in the presence of elevated thyroglobulin. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **49** : 565 (1979)

L.C.P. DE CARVALHO, I.M. ROITT, G. WICK

A three layer immunoradiometric assay for antibodies in different immunoglobulin classes and its application to the detection of chicken thyroglobulin autoantibodies and of antibodies to sheep erythrocytes. *J. Immunol. Methods*, **39** : 15 (1980)

H. ENGLER et al.

Assessment of anti-thyroglobulin and anti-microsomal autoantibodies in patients with autoimmune thyroid diseases: comparison of hemagglutination assay, enzyme-linked immunoassay and radioligand assay. *Chim. Clin Acta*, **179** : 251 (1989).

M. GREINER et al.

A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Meth.*, **185** : 123 (1995)

S.H. INGBAR, K. A. WOEBER

The thyroid gland.

In: *Textbook of Endocrinology*, R.H. Williams ed., W.B. Saunders, Philadelphia, p. **117** (1981)

R. LINDMARK, C. BIRIELL, J. SJÖQUIST

Quantitation of specific IgG antibodies in rabbits by a solid-phase radioimmunoassay with <sup>125</sup>I protein A from *Staphylococcus aureus*. *Scand. J. Immunol.*, **14** : 409 (1981).

M. LUDGATE, G. VASSART

Review – The molecular genetics of three thyroid autoantigens: thyroglobulin, thyroid peroxidase and the thyrotropin receptor. *Autoimmunity*, **7** : 201-217 (1990).

T. MORI, J. P. KRISS

Measurement by competitive binding radioassay of serum anti-microsomal and anti-thyroglobulin antibodies in Graves' disease and other thyroid disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **33** : 688 (1971).

R.L. PEAKE et al.

Radioimmunoassay for antithyroglobulin antibodies.

*J. Lab. Clin. Med.*, **86** : 907 (1974).

A. PINCHERA et al.

Significance of thyroid autoantibodies in autoimmune thyroid diseases.

In: *Autoimmunity and the Thyroid*, P. G. Wolfish, R. J. Wall, R. Volpi eds., Academic Press, Orlando, p. 139 (1985).

S.H. ROMAN et al.

Enzyme-linked immunosorbent microassay and hemagglutination compared for detection of thyroglobulin and thyroid microsomal autoantibodies.

*Clin. Chem.*, **30** (2) : 246 (1984).

G.B. SALABÉ et al.

Radioimmunoassay for human antithyroglobulin antibodies. II: Determination of antigen-binding capacity.  
J. Clin. Endocrinol Metab., **39** : 1125 (1974)

S. SHULMAN

Thyroid antigens and autoimmunity.  
Adv. Immunol., **14** : 85 (1971)

G. TORRIGIANI, I.M. ROITT, D. DONIACH

Quantitative distribution of human thyroglobulin autoantibodies in different immunoglobulin classes.  
Clin. Exp. Immunol., **3** : 621 (1968).

R. VOLPI

Autoimmune thyroid diseases. A perspective.  
Mol. Biol. Med., **3** : 25 (1986).

A.P. WEETMAN, A.M. MCGREGOR

Autoimmune thyroid disease: development in our understanding.  
Endocrinol. Rev., **5** : 309 (1984).



DiaSorin Inc.  
1951 Northwestern Avenue  
P.O. Box 285  
Stillwater, MN 55082-0285 U.S.A.  
Phone: 651-439-9710  
FAX: 651-351-5669

APM0129



DiaSorin S.p.A.,  
13040 Saluggia (VC) Italy

34693 7/10