

ImmunoDOT™ TPO-TG

REF GB 5885



Détection semi-quantitative des auto-anticorps humains dirigés contre la thyroglobuline (TG) et la thyroperoxydase (TPO) dans le sérum humain.

DÉFINITION

Le coffret Test ImmunoDOT™ TPO/TG est un test immunoenzymatique (EIA) en format DOT-BLOT pour la détection semi-quantitative des autoanticorps humains dirigés contre la Thyroglobuline (TG) et la Thyroperoxydase (TPO) dans le sérum pour aider au diagnostic des dysfonctionnements thyroïdiens.

RÉSUMÉ ET EXPLICATIONS

Les désordres auto-immuns de la glande thyroïde sont caractérisés par la détection des autoanticorps antithyroïdiens, en premier ceux dirigés contre les antigènes thyroglobulines et microsomaux de la thyroïde. Récemment il a été montré que la Thyroperoxydase (TPO) est la protéine responsable de l'antigénicité des microsomes. Les autoanticorps thyroïdiens anti-TPO apparaissent dans les sérums de la plupart des patients atteints de maladies auto-immunes de la thyroïde et prédisent une augmentation sérique de la TSH dans les populations témoins, mais n'impliquent pas nécessairement une destruction tissulaire.

Les autoanticorps thyroïdiens sont détectés par des tests immunologiques traditionnels comme :

- l'hémagglutination passive (HA),
- l'immunofluorescence indirecte (IFI),
- l'immunoenzymologie (EIA)
- et la radioimmunologie (RIA).

Le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** utilise une Thyroglobuline humaine hautement purifiée et une Thyroperoxydase humaine recombinée (antigène microsomal) ne contenant pas de Thyroglobuline et/ou de mitochondries contaminantes trouvées dans les autres préparations d'antigènes microsomaux, dans un format DOT-BLOT.

PRINCIPE DU TEST

Le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** utilise une technique EIA DOT-BLOT pour la détection des anticorps. Les différents antigènes sont déposés dans des puits séparés, le tout sur une membrane solide.

Après avoir déposé l'échantillon dans la cuve, une bande réactive est insérée, pour laisser les anticorps du patient se fixer sur le support solide de la membrane.

Dans un deuxième temps, la réaction est amplifiée en éliminant ce qui s'est fixé non spécifiquement.

Pendant la troisième étape, le conjugué anti-immunoglobulines humaines lié à la phosphatase alcaline est ajouté et se fixe au complexe auto-anticorps/ antigène.

Finalement, la membrane est transférée dans un substrat enzymatique qui réagit avec la phosphatase alcaline fixée pour produire des cercles distincts.

CONDITIONS DE CONSERVATION

- Conserver les réactifs et les bandelettes entre +2°C et +8°C.
- Les réactifs doivent être amenés à température ambiante (entre +15°C et + 30°C) avant utilisation. Ils doivent être utilisés dans l'heure qui suit leur mise en place dans le poste de travail chauffé.
- Eviter la contamination des réactifs, qui peut produire des résultats erronés.

COMPOSITION DU COFFRET

Bandelettes ImmunoDOT™ TPO/TG	50
<ul style="list-style-type: none"> ⊗ Contrôle positif ⊗ Anti-TPO (valeur seuil) ⊗ Anti-TPO (valeur positive) ⊗ Anti-TG (valeur seuil) ⊗ Anti-TG (valeur positive) ○ Contrôle négatif 	
Diluant DIL SPE <i>composé de diluant tamponné (pH 6,2-7,6), de stabilisateur de protéines et de NaN₃<0,1%.</i>	2 x 50 ml
Activateur SOLN ENH <i>composé de chlorure de sodium et d'azide de sodium < 0,1%.</i>	2 x 50 ml
Conjugué CONJ IgG <i>composé d'anticorps anti-humains de chèvre conjugués à la phosphatase alcaline, dans un tampon (pH 6,2-8,5), et associé à des protéines stabilisantes et d'azide de Sodium <0,1% comme agent conservateur.</i>	2 x 50 ml
Révélateur SUBS BCIP-NBT <i>[substrat] composé de phosphate de 5-bromo-4-chloro-3-indolyte et de chlorure de p-nitro tétrazolium bleu dans un tampon (pH 9,0-11,0), 0,8 % de diméthylformamide et d'azide de Sodium < 0,1%.</i>	2 x 50 ml
Cuves de réactions	200
Notice technique	1

MATÉRIEL NÉCESSAIRE NON FOURNI

- Station de travail (incubateur)
- Système de prélèvement d'échantillons
- Chronomètre
- Eau distillée ou déionisée pour analyses, utilisée comme clarifiant
- Pipettes
- Papier absorbant pour essuyer les bandes de test
- Contrôle positif

ÉCHANTILLONS

- Le test **ImmunoDOT™ TPO/TG** nécessite 10µl de sérum ou 20µl de sang total hépariné.
- Le sérum et le sang total doivent être collectés selon les procédures standards.
- Ils peuvent être conservés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours au maximum.
- Si le dosage est prévu dans un délai plus long, conserver les sérums à -20°C. Ne pas congeler les échantillons de sang total.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

Réservé au diagnostic in vitro.

Les réactifs du Test **ImmunoDOT™ TPO/TG** ont été choisis de façon à former un système optimal. Ne pas les remplacer par d'autres réactifs ou d'autres systèmes d'analyse **ImmunoDOT**.

La dilution ou la modification de ces réactifs peut également modifier les performances du test.

Ne pas utiliser les coffrets après la date de péremption.

Utiliser de l'eau distillée ou déionisée en bouteille comme clarifiant.

Il faut observer strictement les procédures du test pour obtenir des résultats optimaux. Ne pas raccourcir ni prolonger les temps d'incubation indiqués, sous peine d'obtenir de mauvais résultats.

Certains composants du coffret contiennent de l'azide de sodium, qui peut réagir dans les canalisations de plomb et de cuivre pour former des azides de métal très explosifs. Lors de l'élimination de ces composants, rincer avec un grand volume d'eau pour empêcher l'accumulation de l'azide.

Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif, concernant les anticorps anti-VIH 1 et 2, HTLV-1, les anticorps anti-VHC et l'antigène Hbs. Toutefois, s'agissant de produits potentiellement infectieux, il est nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.

PRÉPARATION DU TEST

Avant la manipulation, ramener tous les réactifs à température ambiante.

1. Allumer la station de travail et régler la température en fonction des instructions d'utilisation de votre appareil.
2. Sortir 4 cuves de réaction et les introduire dans les emplacements appropriés de la station de travail.

Pour la station de travail (grand format) : ajouter de l'eau distillée jusqu'à la ligne de remplissage du réservoir de clarifiant prévu.

Pour la station de travail (petit format) : utiliser un récipient adéquat et suffisamment d'eau distillée pour couvrir toutes les fenêtres de réaction de la membrane.

3. Identifier une bandelette pour chaque échantillon.
4. Placer :
 - 2 ml de diluant (n° 1) dans la cuve de réaction n° 1
 - 2 ml d'activateur (n° 2) dans la cuve de réaction n° 2
 - 2 ml de conjugué (n° 3) dans la cuve de réaction n° 3
5. Laisser incubé 10 minutes.
6. Vérifier que la température du bloc chauffant soit conforme aux instructions du manuel d'utilisation propre au modèle de la station de travail.
7. Dans le cas de l'utilisation de la station de travail « grand format », insérer l'extrémité de la bandelette dans le support, une bandelette par cannelure, faire attention de ne pas toucher les puits de réaction.
8. Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes, juste avant de commencer le protocole opératoire. Éviter la formation de bulles d'air.

MODE OPÉRATEUR

1. INCUBATION DES SERUMS

- Ajouter 10µl de sérum échantillon ou 20µl de sang total dans la cuve 1.
- Plonger la bandelette dans la cuve 1.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incubé 5 mn.**

2. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à

ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.

- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

3. ACTIVEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 2.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incubé 5 mn.**

4. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

5. CONJUGUE

- Placer la bandelette dans la cuve 3.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incubé 15 mn.**
- **Au début de cette incubation, verser 2 ml de réactif 4 dans la cuve N°4.**

6. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.
- Immerger la bandelette dans le clarifiant (eau distillée).
- **Laisser tremper 5 mn sans agiter.**
- Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant.

7. REVELATEUR

- Placer la bandelette dans la cuve 4.
- Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut.
- **Laisser incubé 5 mn.**

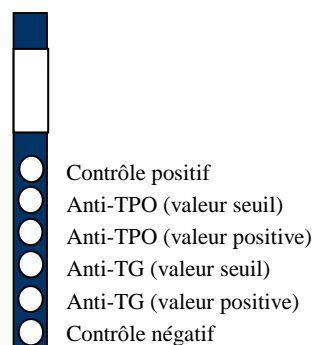
8. LAVAGE

- Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite durant 10 secondes de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane.

9. SECHAGE

- Éliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et **laisser sécher pendant 5 min avant d'interpréter le résultat.** Les bandelettes doivent être parfaitement sèche avant d'être lues. **Un faux positif peut apparaître si la bandelette n'est pas complètement sèche.**

10. LECTURE DE LA BANDE D'ANALYSE



Seuil de positivité : un spot avec un contour délimité.

Positif : La réaction positive peut être d'intensité variable (spot seulement cerclé à uniforme très intense).

Négatif : Aucun cercle n'est visible. Si les contours sont difficilement discernables, ou de faible intensité, les résultats sont considérés comme négatifs.

Chaque fenêtre doit être lue indépendamment.

CRITÈRES DE VALIDATION DU TEST

Le contrôle positif doit présenter un spot de couleur bleue avec un contour nettement délimité.

Le contrôle négatif ne doit présenter aucun spot ou cercle.

Ces réactions permettent de valider la réalisation du test. Si un des contrôles est invalide, le test ne doit pas être interprété et l'essai doit être répété.

Pour une interprétation aisée et fiable, vérifier que les bandelettes soient totalement sèches.

Le spot obtenu pour le contrôle positif ne doit pas être utilisé comme un calibrateur ou un étalon.

Les réactions positives des puits contenant des antigènes peuvent être plus foncées que le contrôle positif, ou moins foncées, en fonction de leur concentration en anticorps.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour contrôler les différentes spécificités. Le contrôle multiparamétrique (bmd, réf : HM020) renferme des anticorps humains dirigés contre l'une des spécificités recherchées. Il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

L'analyse est réalisée avec des réactifs chauffés à **+44°C/+48°C**. La température de la station de travail doit dépasser la température d'analyse dans la cuve de réaction. La température de la station de travail doit être surveillée.

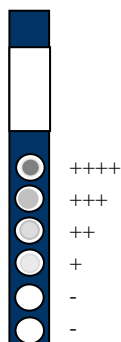
LIMITES DE LA TECHNIQUE

⇒ Pour établir le diagnostic du patient, les facteurs épidémiologiques, les résultats cliniques et autres résultats de laboratoire devront être pris en compte en complément des résultats de ce test.

⇒ Les autoanticorps antithyroïdiens peuvent être présents dans certains désordres non-thyroïdiens tels que le syndrome de Sjögren, l'anémie pernicieuse, la maladie d'Addison, les myasthénies graves et le diabète mellitus et également chez certains sujets apparaissant en bonne santé.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Il y a deux niveaux de concentration antigénique pour chaque antigène (TG et TPO). Interpréter chacun individuellement d'après les critères suivants :



Aucun puits positif

Résultats : NEGATIF	Anti-TPO UI/ml	Anti-TG UI/ml
Pas de réaction auto-immune significative	<40	<100

Un puits positif (valeur seuil uniquement)

Résultats : A CONFIRMER	Anti-TPO UI/ml	Anti-TG UI/ml
Equivoque, à confirmer sur un second prélèvement	40-65	100-165

Deux puits positifs (seuil et positif)

Résultats : POSITIF	Anti-TPO UI/ml	Anti-TG UI/ml
+ (cercle)	66-130	166-330
++ (spot uniforme faible)	131-260	331-660
+++ (spot uniforme intense)	261-520	661-1320
++++ (spot intense)	>520	>1320

Lorsque les deux puits sont positifs, seul le puits « Valeur positive » est interprété par rapport à la bandelette colorée de référence pour rendre un résultat semi-quantitatif. Ces taux restent indicatifs, mais découlent de la corrélation avec les coffrets ELISA de bmd : TG-LISA et TPO-LISA.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

Le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** a été testé vis à vis de patients présumés normaux d'une part et des patients ayant des anticorps anti-Thyropéroxydase et Thyroglobuline (méthode IHA). Les résultats des patients normaux (n = 125) montrent une spécificité de 91 % en TPO et de 96 % en TG (Tableau 1).

Tableau 1 - Patients Normaux

Spécificité	Non réactif	A confirmer	Positif
TPO	91.2% (114/125)	6.4% (8/125)	2.4% (3/125)
TG	96% (120/125)	4.0% (5/125)	0% (0/125)

66 patients positifs en hémagglutination (HA) ont été testés avec le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** pour les anti-TPO afin d'évaluer la sensibilité vis à vis de cette technique classique. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous (tableau 2).

Tableau 2 - Anticorps anti-Thyropéroxydase (TPO)

Titre IHA	Non réactif	A confirmer	Positif
100	0	4	1
400	0	6	12
1600	0	0	28
6400	0	0	9
25600	0	0	6

Considérant qu'un titre supérieur ou égal au 1:1600 (en HA) est cliniquement significatif, le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** est sensible à 100 % pour la détection des anticorps anti-TPO (43/43) lorsqu'il est comparé à l'HA. De plus, **ImmunoDOT™ TPO/TG** a identifié 13 des 23 cas limites en HA (1:100-400) comme clairement POSITIFS.

21 patients positifs en hémagglutination (HA) ont été testés avec le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** pour les anticorps anti-Thyroglobuline, afin d'évaluer la sensibilité vis à vis de cette technique classique. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous (tableau 3).

Tableau 3 - Anticorps anti-Thyroglobuline (TG)

Titre IHA	Non réactif	A confirmer	Positif
80	1	0	2
160	1	1	0
320	0	2	2
640	0	0	4
>1280	0	0	8

Considérant qu'un titre supérieur ou égal au 1:160 (en HA) est cliniquement significatif, le coffret **ImmunoDOT™ TPO/TG** est sensible à 94 % pour la détection des anticorps anti-Thyroglobuline (17/18) lorsqu'il est comparé à l'HA. De plus l'**ImmunoDOT™** a identifié 2 des 3 cas limites en HA (1:80) comme clairement POSITIFS.

BIBLIOGRAPHIE

Czarnocka B, et.al. "Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases" *FEBS* 190:147 (1985)

Yoshida H, et.al. "Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: study of seventy autopsied cases" *J Clin Endoc Metab* 46:859 (1978)

Hooper B, et.al. "Autoimmunity in a rural community" *Clin Exp Immunol* 12:79 (1972)

Doniach D. "Humoral and genetic aspects of thyroid autoimmunity" *Clin Endocrinol Metab* 4:267 (1975)

Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (1983)

Hijmans W, et.al. "Serological overlap between lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and thyroid autoimmune disease" *Brit Med J* 2:909 (1961)

Evered DC, et.al. "Grades of Hypothyroidism" *Brit Med J* 1:675 (1973)

Volpe R. "The role of autoimmunity in hypoendocrine and hyperendocrine function: with special emphasis in autoimmune thyroid disease" *Ann Int Med* 87:86 (1977)

INDEX DES SYMBOLES



Déclaration de conformité CE



Test rapide



Dispositif de Diagnostic *In Vitro*



Référence Catalogue



Numéro de Lot



Date d'expiration



Nombre de tests



Consulter les instructions d'utilisation



Limites de température



Risque biologique



Contient de l'azide de sodium



A reconstituer

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

Préparation : STATION DE TRAVAIL	<ul style="list-style-type: none"> Allumer et préparer la station de travail (selon le modèle). La température dans les cuves doit être comprise entre +44°C et +48°C. Immerger la bandelette dans le bain d'eau distillée pendant 30 secondes. Distribuer : <ul style="list-style-type: none"> - 2 ml de diluant (1) dans la cuve 1 - 2 ml d'activateur (2) dans la cuve 2 - 2 ml de conjugué (3) dans la cuve 3 Laisser incuber 10 mn. 	INCUBATION 10 minutes
1. INCUBATION DES SERUMS	<ul style="list-style-type: none"> Ajouter 10 µl de sérum échantillon ou 20 µl de sang total dans la cuve 1. Plonger la bandelette dans la cuve 1. Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. Laisser incuber 5 mn. 	INCUBATION 5 minutes
2. LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes
3. ACTIVATEUR	<ul style="list-style-type: none"> Placer la bandelette dans la cuve 2. Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. Laisser incuber 5 mn. 	INCUBATION 5 minutes
4. LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes
5. CONJUGUE	<ul style="list-style-type: none"> Placer la bandelette dans la cuve 3. Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. Laisser incuber 15 mn. Au début de cette incubation, verser 2 ml de réactif 4 dans la cuve N°4. 	INCUBATION 15 minutes
6. LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que l'eau diffuse parfaitement au travers de la membrane. Immerger la bandelette dans le clarifiant (eau distillée). Laisser tremper 5 mn. Éliminer le surplus d'eau distillée sur un papier absorbant. 	10 secondes puis INCUBATION 5 minutes
7. REVELATEUR	<ul style="list-style-type: none"> Placer la bandelette dans la cuve 4. Homogénéiser en agitant 10 fois de bas en haut. Laisser incuber 5 mn. 	INCUBATION 5 minutes
8. LAVAGE	<ul style="list-style-type: none"> Laver la bandelette dans le clarifiant (eau distillée) en l'agitant de gauche à droite de façon à ce que le clarifiant (eau distillée) diffuse parfaitement au travers de la membrane. 	10 secondes
9. SECHAGE	<ul style="list-style-type: none"> Éliminer l'eau résiduelle avec un papier absorbant, et <u>laisser sécher avant d'interpréter le résultat.</u> 	5 minutes

BioMédical Diagnostics SA



Siège social

Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tél : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com

ImmunoDOT™ TPO-TG

REF

GB 5885

50

Qualitative detection of autoantibodies against human thyroglobulin and human thyroid peroxidase (microsome).

INTENDED USE

The **ImmunoDOT™ TPO/TG** is an enzyme immunoassay (EIA) test for screening and detection of autoantibodies against human thyroglobulin and human thyroid peroxidase (microsome) in serum and heparinized whole blood and is used as an aid in the diagnosis of thyroid disorders. This product is intended for use in physician offices and clinical laboratories.

SUMMARY AND EXPLANATION

Autoimmune thyroid gland disorders are characterized by detection of anti-thyroid antibodies, primarily against thyroglobulin and/or microsomal thyroid antigens. Recently it has been shown that thyroid peroxidase (TPO) is the protein responsible for microsomal antigenicity. In addition to chronic thyroiditis, thyroid autoantibodies may be found in other thyroid disorders. These autoantibodies may also occur in apparently normal subjects. Thyroid microsomal (TPO) autoantibodies occur in sera of most autoimmune thyroid disease patients and predict raised serum TSH levels in random populations. The presence of autoantibody does not imply active tissue destruction. Microsomal (TPO) antibody level correlates with the degree of lymphoid infiltration of the thyroid gland.

Thyroid autoantibodies are detected by a variety of immunoassays. The common methods are indirect hemagglutination (IHA), indirect fluorescent antibody (IFA), EIA And RIA techniques.

ImmunoDOT™ TPO/TG Test uses highly purified human thyroglobulin devoid of microsomal antigen and recombinant human thyroid peroxidase (microsomal antigen) which does not contain contaminating thyroglobulin and/or mitochondria found in other microsome antigen preparations. These purified antigens are used in a dipstick format enzyme immunoassay technique.

ASSAY PRINCIPLE

The **ImmunoDOT™ TPO/TG** Test utilizes an EIA dot technique for the detection of antibodies. The antigens are dispensed as discrete dots onto a solid membrane.

After adding specimen to a reaction vessel, an assay strip is inserted, allowing patient antibodies reactive with the test antigen to bind to the strip's solid support membrane.

In the second stage, the reaction is enhanced by removal of non-specifically bound materials.

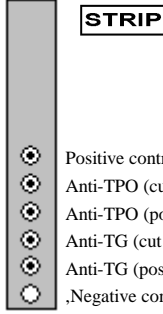
During the third stage, alkaline phosphatase-conjugated anti-human antibodies are allowed to react with bound patient antibodies.

Finally, the strip is transferred to enzyme substrate reagent which reacts with bound alkaline phosphatase to produce an easily seen, distinct dot.

STORAGE CONDITIONS

- Store reagents and assay strips between +2°C and +8°C.
- Reagents must be at room temperature (between +15°C and +30°C) before use. They should be used within one hour following placement in the heated workstation (incubator)
- Avoid contamination of reagents as that can give erroneous results.

MATERIAL PROVIDED

ImmunoDOT™ TPO/TG Assay strip		50
 <p>STRIP</p> <ul style="list-style-type: none"> ⊕ Positive control ⊕ Anti-TPO (cut off value) ⊕ Anti-TPO (positive value) ⊕ Anti-TG (cut off value) ⊕ Anti-TG (positive value) ○ Negative control 		
Diluent <i>buffered diluent (pH 6.2-7.6), protein stabilizers, and <0.1% NaN₃.</i>	DIL SPE	2 x 50mL
Enhancer <i>sodium chloride and <0.1% NaN₃.</i>	SOLN ENH	2 x 50mL
Conjugate <i>alkaline phosphatase conjugated goat anti-human antibodies in buffered diluent (pH 6.2-8.5) and stabilizers.</i>	CONJ IgG	2 x 50mL
Developer <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate and p-nitro blue tetrazolium chloride in buffered diluent (pH 9.0-11.0), 0.8% N, N-Dimethylformamide, and <0.1% NaN₃</i>	SUBS BCIP-NBT	2 x 50mL
Reaction Vessels		200
Package Insert		1

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Workstation (incubator)
- Specimen collection apparatus
- Timer
- Analytical quality distilled or deionized water to be used for the washes.
- Pipets
- Absorbent toweling to blot dry the assay strip
- Positive control serum

SAMPLE COLLECTION AND HANDLING

- The **ImmunoDOT™ TPO/TG Test** is performed on serum or heparinized whole blood. The test requires approximately 10µL of serum or 20 µL of whole blood.
- Serum and heparinized whole blood are collected according to standard practices
- Serum and heparinized whole blood may be stored at +2°C and +8°C for up to five days.
- Serum may be frozen below -20°C for extended periods. Freezing whole blood samples is not advised.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

For *In Vitro* Diagnostic Use Only.

The **ImmunoDOT™ TPO/TG** reagents have been optimized for use as a system. Do not substitute reagents or strips from any other source including those from other **ImmunoDOT™** systems.

Dilution or modification of these reagents may also affect the performance of the test.

Do not use kits after the stated expiration date.

Analytical quality deionized or distilled water must be used for the washes.

Strictly adhere to the test procedures for optimal results. Do not shorten or prolong stated incubation times as this may result in poor assay performance.

Some assay components contain sodium azide (NaN₃) that may react with lead and copper plumbing to form highly explosive metal azides. After disposing of reagents, flush sink with a large volume of water to prevent azide buildup.

Human sera used in the preparation of this product were tested and found non-reactive for hepatitis B surface antigen and for antibodies to HIV-1, HIV-2, HTLV-1, and hepatitis C virus. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle reagents and patient samples as if capable of transmitting infectious disease.

SETUP

1. Turn on Workstation and adjust temperature according to the instructions for use of your instrument.

2. Remove 4 Reaction Vessels per test from the product box and insert into appropriate slots in Workstation.

For the large Workstation, add water up to the fill line of the Wash Vessel provided.

For the small Workstation, use an appropriate container and sufficient water to cover all reactive windows of the assay strip.

3. Appropriately label the Assay Strips.

4. Place:

- 2 mL Diluent (#1) in Reaction Vessel #1
- 2 mL Enhancer (#2) in Reaction Vessel #2
- 2 mL Conjugate (#3) in Reaction Vessel #3

5. Incubate for 10 minutes.

6. Verify that the temperature of the heating block is in accordance with the instructions of the manual corresponding to the model of the workstation.

7. If the large Workstation is used, insert the label end of the Assay Strip into the Strip Holder, one per groove, taking care not to touch the assay windows.

8. Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds, just before starting the assay procedure. Avoid the formation of bubbles on the surface.

ASSAY PROCEDURE

1. SAMPLE INCUBATION

- Add specimen (10µL of serum or 20µL of whole blood) to Reaction Vessel #1.
- Plunge assay strip into Reaction Vessel #1
- Using 10 quick up and down motions with the Assay Strip, mix reagents and specimen thoroughly.
- **Let stand for 5 minutes.**

2. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel and swish in the Wash (distilled water). Use a swift back and forth motion for 10 seconds allowing for optimal washing of the Assay Strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

3. ENHANCER

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #2.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- **Let stand for 5 minutes.**

4. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #2 and swish in the Wash for 10 seconds as described (step #2). The wash should diffuse completely through the strip.
- Blot the strip on an absorbent towel.

5. CONJUGATE

- Place Assay Strip into Reaction Vessel #3.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- **Let stand for 15 minutes.**
- **At the beginning of this incubation, place 2mL of reagent #4 into the Reaction Vessel #4.**

6. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #3 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip
- DO NOT remove the Assay Strip from the wash.
- **Allow the Assay Strip to stand in the wash for 5 minutes.**
- Blot the strip on an absorbent towel.

7. DEVELOPER

- Remove Assay Strip from wash and place into Reaction Vessel #4.
- Mix thoroughly with 10 quick up and down motions.
- **Let stand for 5 minutes.**

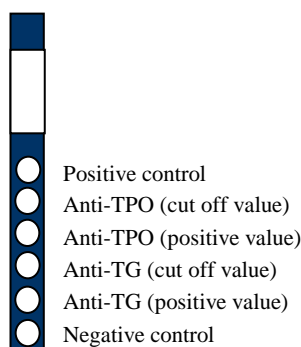
8. WASH STEP

- Remove Assay Strip from Reaction Vessel #4 and swish in the Wash as described (step #2) for 10 seconds. The wash should diffuse completely through the strip.

9. DRY

- Blot and allow Assay Strip to dry. It is imperative that tests of borderline specimens be interpreted after the Assay Strip has been allowed to dry. **A false positive dot may be identified if the assay strip is not dry when interpreted.**

10. READING THE ASSAY STRIP



Positive cut off: a dot with an **EASILY SEEN**, distinct border.

Positive: a dot with an **EASILY SEEN**, distinct border is visible in the center of the window. The outer perimeter of the window must be white to pale gray.

Negative: no dot - If no dot is seen or a dot is difficult to see, interpret it as negative.

Each dot of the assay strip must be read independently.

TEST VALIDATION

The top and bottom membrane windows of the Assay Strip are reagent controls.

The top window is a positive reagent control and must be positive for further interpretation.

The bottom window is the reagent negative control and must be negative for further interpretation.

Reagent controls assure that reagents are active and that the test has been performed properly. If either reagent control is invalid, the test must be repeated.

The intensity of the positive control dot must not be used as a calibrator.

Positive reactions in the antigen windows of the strip may be either darker or lighter than the positive control depending on the antibody titer.

QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally or externally sourced control material for the different specificities. Multiparametric control (bmd, Cat: HM020) contains antibodies directed against one of the specificities; handle in the same way as samples.

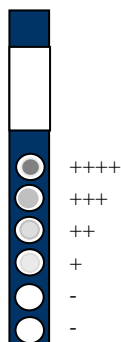
The assay is performed with reagents warmed at +44°C/+ 48°C. The temperature of the Workstation itself should be higher than the assay temperature in the reaction vessel. The Workstation should be monitored to assure the appropriate temperature is maintained.

LIMITATIONS

- ⇒ Epidemiologic factors, clinical findings, and other laboratory results should be considered in addition to autoantibody laboratory results for diagnosis of the patient.
- ⇒ Thyroid autoantibodies may be present in non-thyroid disorders such as Sjögren's syndrome, pernicious anemia, Addison's disease, myasthenia gravis and diabetes mellitus and in apparently healthy subjects.

INTERPRETATION

There are two reaction levels for each analyte (thyroglobulin and TPO). Interpret each analyte reaction separately and according to the following criteria:



No positive Dots

Results: NEGATIVE	Anti-TPO IU/ml	Anti-TG IU/ml
Nonreactive for autoantibody	<40	<100

One positive Dot (Only cut off Dot)

Results: TO CONFIRM	Anti-TPO IU/ml	Anti-TG IU/ml
Equivocal but to confirm on a second sample	40-65	100-165

Two positive Dots (Cut off and positive)

Results: POSITIVE	Anti-TPO IU/ml	Anti-TG IU/ml
+ (dot with distinct border)	66-130	166-330
++ (weak uniform dot)	131-260	331-660
+++ (intense uniform dot)	261-520	661-1320
++++ (intense dot)	>520	>1320

When the two Dots are positive, only the spot "Value positive" is interpreted compared to the reference colored strip to have a result semi-quantitative. These values are indicative, but were obtained from a correlation with bmd ELISA kits: TG-LISA and TPO-LISA.

PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS OF THE TEST

ImmunoDOT™ TPO/TG Test was tested with presumptive normal samples and microsome and thyroglobulin positive (IHA) samples. The results in normal samples (n=125) predict assay specificity in a random, normal population and are shown in **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** These data predict the TPO assay to be 91% specific and the thyroglobulin to be 96% specific. These data are consistent with previous reports.

Table 1 – Normal samples

Specificity	Non reactive	To confirm	Positive
TPO	91.2% (114/125)	6.4% (8/125)	2.4% (3/125)
TG	96% (120/125)	4.0% (5/125)	0% (0/125)

Sixty-six (66) indirect hemagglutination (IHA) positive samples were evaluated in the **ImmunoDOT™ TPO/TG** Test for anti-TPO (microsome) to assess test sensitivity compared to the classic test method. These results are shown in Table 1.

Table 1: Thyroid Peroxidase (microsome)

IHA Titer	Non reactive	To confirm	Positive
100	0	4	1
400	0	6	12
1600	0	0	28
6400	0	0	9
25600	0	0	6

Assuming that an IHA titer greater than or equal to 1:1600 is clinically relevant, the **ImmunoDOT™ TPO/TG** Test for anti-TPO (microsome) is 100% (43/43) sensitive when compared to IHA. Unlike the IHA method, **ImmunoDOT™ TPO/TG** identified 13 of the 23 borderline (1:100-400) IHA results as clearly reactive samples.

Twenty-one thyroglobulin (Tg) IHA positive samples were tested in the **ImmunoDOT™ TPO/TG** Test for anti-thyroglobulin. These results are shown in Table 2.

Table 2: Thyroglobulin

IHA Titer	Non reactive	To confirm	Positive
80	1	0	2
160	1	1	0
320	0	2	2
640	0	0	4
>1280	0	0	8

Assuming that an IHA titer greater than or equal to 1:160 is clinically relevant, the **ImmunoDOT™ TPO/TG** Test for anti-thyroglobulin is 94% (17/18) sensitive when compared to IHA. In addition, **ImmunoDOT™ TPO/TG** identified two out of three borderline (1:80) IHA positives as clearly reactive samples.

REFERENCES

Czarnocka B, et.al. "Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases" *FEBS* 190:147 (1985)

Yoshida H, et.al. "Association of serum antithyroid antibodies with lymphocytic infiltration of the thyroid gland: study of seventy autopsied cases" *J Clin Endoc Metab* 46:859 (1978)

Hooper B, et.al. "Autoimmunity in a rural community" *Clin Exp Immunol* 12:79 (1972)

Doniach D. "Humoral and genetic aspects of thyroid autoimmunity" *Clin Endocrinol Metab* 4:267 (1975)











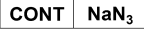

Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories* (1983)

Hijmans W, et.al. "Serological overlap between lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and thyroid autoimmune disease" *Brit Med J* 2:909 (1961)

Evered DC, et.al. "Grades of Hypothyroidism" *Brit Med J* 1:675 (1973)

Volpe R. "The role of autoimmunity in hypoenocrine and hyperendocrine function: with special emphasis in autoimmune thyroid disease" *Ann Int Med* 87:86 (1977)

SYMBOLS USED

	EC Declaration of conformity
	Rapid test
	<i>In Vitro</i> Diagnostic Device
	Catalogue number
	Lot Number
	Expiry Date
	Number of test
	Consult Instructions
	Temperature limitation
	Biological risk
	Contains sodium azide
	Reconstitute with

SUMMARY OF METHOD

SETUP	<ul style="list-style-type: none"> • Turn on and prepare the workstation (according to the model). The temperature in vessels must lie within +44°C and +48°C. • Insert the strip in the distilled water bath (Wash) for 30 seconds. • Pipet: <ul style="list-style-type: none"> - 2 mL of diluent (#1) into reaction vessel #1 - 2 mL of enhancer (#2) into reaction vessel #2 - 2 mL of conjugate (#3) into reaction vessel #3 • Incubate for 10 min. 	INCUBATION 10 minutes
1. INCUBATION OF SERA	<ul style="list-style-type: none"> • Add 10 µL of sample sera or positive control to vessel #1. • Immerse strip in reaction vessel #1. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 60 min. 	INCUBATION 5 minutes
2. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds
3. ENHANCER	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #2. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 5 min. 	INCUBATION 5 minutes
4. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds
5. CONJUGATE	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #3. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 30 min. • At the start of this incubation, place 2 mL of reagent #4 into vessel #4. 	INCUBATION 15 minutes
6. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. • Immerse the strip in the Wash (distilled water). Let stand 5 minutes. • Blot the assay strip on an absorbent towel. 	10 seconds then INCUBATION 5 minutes
7. DEVELOPER	<ul style="list-style-type: none"> • Place strip into vessel #4. • Mix using a swift up and down motion 10 times. • Incubate for 5 min. 	INCUBATION 5 minutes
8. WASH STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Wash the strip in the Wash (distilled water) using a swift back and forth motion from left to right so that the water diffuses completely through the membrane. 	10 seconds
9. DRY STEP	<ul style="list-style-type: none"> • Remove the residual water with absorbent paper, and let dry before interpreting the result. 	WAIT 5 minutes

BioMédical Diagnostics SA



Office
Actipole 25
4 bld de Beaubourg
77435 Marne la Vallée Cx2
France

Tel : 33 1 64 62 10 12
Fax : 33 1 64 62 09 66

E-mail : support@bmd-net.com
Internet : www.bmd-net.com