

FIDIS™ Thyro

REF **MX 002**



DÉFINITION

Le coffret **FIDIS™ Thyro** constitue une méthode d'identification quantitative d'autoanticorps sur supports particuliers utilisant un système de détection par cytométrie de flux. Il permet la recherche simultanée de 2 autoanticorps dirigés contre la thyroperoxydase (TPO) et la thyroglobuline (TG).

VALEUR DIAGNOSTIQUE

Les pathologies thyroïdiennes auto-immunes sont caractérisées par la présence d'autoanticorps dirigés principalement contre 2 antigènes majeurs: la thyroperoxydase (TPO) et la thyroglobuline (TG).

L'un ou l'autre, ou les deux types d'autoanticorps anti-thyroperoxydase (anti-TPO) et anti-thyroglobuline (anti-TG) sont généralement présents à des concentrations moyennes dans la maladie de Basedow (ou maladie de Graves) et à des taux plus élevés dans la thyroïdite de Hashimoto.

Pathologie	Anti-TPO	Anti-TG
Hashimoto	99 %	85 %
Thyroïdite atrophique	99 %	85 %
Basedow / Graves	75 %	50 %
Adultes sains	4-8 % 15 % <i>après 60 ans</i>	4-8 % 15 % <i>après 60 ans</i>

Les anti-TG sont un peu moins sensibles que les anti-TPO et exceptionnellement isolés; leur recherche est donc indiquée devant des anti-TPO négatifs dans un contexte où une thyroïdite auto-immune est néanmoins suspectée.

De plus, une étude récente a démontré un accroissement de 100 % du taux d'avortements spontanés chez les femmes pour lesquelles ont été détectées des autoanticorps thyroïdiens dans le premier trimestre de la grossesse.

Les anti-TG et anti-TPO sont élevés chez 4 à 8% des sujets sains et plus encore chez la femme et après 60 ans. Ils sont assez souvent élevés dans d'autres MAI, sans que l'atteinte fonctionnelle de la glande soit fréquente.

PRINCIPE DU TEST

FIDIS™ Thyro repose sur l'utilisation de microsphères de taille uniforme différemment colorées et d'un cytomètre en flux interfacé avec un système informatique de digitalisation et de traitement du signal. Une diode rouge du cytomètre en flux, en classant chaque catégorie de microsphères sur la base de sa fluorescence unique (du rouge à l'orange), permet l'identification du paramètre analysé. Parallèlement un laser excite la fluorescence d'un composé secondaire

pour quantifier la réaction spécifique qui y est associée.

Chaque antigène (TPO recombinante et TG humaine purifiée) nécessaire à la réalisation du test est couplé de façon covalente à une catégorie de microsphères colorées. Les différentes catégories sont ensuite mélangées pour constituer le réactif final, support des réactions immunologiques spécifiques avec les différents autoanticorps recherchés.

Le coffret **FIDIS™ Thyro** permet de détecter 2 anticorps spécifiques : **les anticorps anti-TPO et anti-TG**.

Le test est réalisé dans une microplaque de filtration de 96 puits.

- Au cours d'une première étape, les échantillons dilués des patients à tester sont incubés en présence des microsphères sensibilisées par les antigènes TPO et TG. Si l'échantillon contient un ou plusieurs anticorps recherchés, ceux-ci vont se fixer au(x) antigène(s) correspondant(s) sur les différentes catégories de microsphères.

- Après incubation, un lavage par filtration permet d'éliminer les éléments non fixés.

- Un anticorps secondaire conjugué à la phycoérythrine dirigé contre les immunoglobulines humaines **d'isotype IgG** permet de révéler les anticorps précédemment capturés.

- Une étape de lavage finale stoppe la réaction et permet d'éliminer les anticorps non liés.

- La réaction est alors mesurée par le cytomètre en flux qui identifie chaque type de microsphères et mesure la fluorescence moyenne des conjugués fixés.

- Un système de calibration permet, par interpolation, de définir la valeur de l'échantillon en unité internationale (UI/ml) pour chaque spécificité antigénique.

Le coffret **FIDIS™ Thyro** peut être utilisé avec l'automate de dilution/répartition **CARIS™**.

ÉCHANTILLONS

- Utiliser du sérum.
- Eviter d'utiliser des sérums lipémiques ou hémolysés, ainsi que des prélèvements congelés et décongelés plus d'une fois.
- Si le dosage n'est pas effectué immédiatement, les échantillons devront être conservés réfrigérés entre +2°C et +8°C pendant 5 jours maximum. Au-delà ils devront être congelés à -20°C.
- Afin de limiter toute fixation non spécifique, il est conseillé de centrifuger et de filtrer les échantillons congelés depuis plus de 6 mois et troubles.

COMPOSITION DU COFFRET

Plaque de 96 micropuits à membrane filtrante munie d'un couvercle MP	1 plaque
Flacon (A) de 2 catégories de microsphères colorées sensibilisées par les antigènes : Thyroperoxydase recombinant (TPO) et Thyroglobuline humaine purifiée (TG). <u>Lyophilisées</u> (à reconstituer avec le tampon D) MICROSPHERES	Qsp 6ml
Flacon (B1) tampon de dilution des échantillons (flacon blanc) <u>Prêt à l'emploi</u> DIL SPE	2 x 115ml
Flacon de calibre* titré en unité internationale (UI/ml) pour les spécificités mesurées. <u>Prêt à l'emploi</u> Les titres sont indiqués sur l'étiquette du flacon. CAL	1 x 1,5ml
Flacon de contrôle positif donnant une réactivité standardisée et constituant un témoin de réaction destiné à vérifier l'activité des réactifs et le bon fonctionnement de l'essai <u>A diluer</u> Les valeurs attendues sont indiquées sur l'étiquette du flacon. CONTROL +	1 x 250µl
Flacon de contrôle négatif <u>A diluer</u> CONTROL -	1 x 250µl
Flacon de conjugué anti-IgG humaines couplées à la phycoérythrine <u>Prêt à l'emploi.</u> CONJ IgG	1 x 12ml
Flacon (C1) de tampon de lavage (flacon noir) <u>Prêt à l'emploi</u> BUF WASH	1 x 100ml
Flacon (D) de tampon de reconstitution des microsphères <u>Prêt à l'emploi</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6ml

Les titres* du calibre (UI/ml) sont standardisés par rapport aux références internationales : 66/387 WHO pour les autoanticorps anti-thyroperoxydase et 65/93 WHO pour les autoanticorps anti-thyroglobuline.

MATÉRIEL NECESSAIRE NON FOURNI

- Pipettes de précision capables de délivrer précisément de 5µl à 1000 µl.
- Pipette multicanaux ou distributeur répétitif capables de délivrer précisément de 40µl à 300µl ou 5µl à 2 ml.
- Agitateur
- Chronomètre
- Sonicateur
- Papier absorbant
- Pipettes sérologiques
- Films pour microplaques

STABILITÉ ET CONDITIONS DE CONSERVATION

- Tous les réactifs doivent être conservés entre +2°C et +8°C dans leur conditionnement d'origine.
- Ne pas congeler les réactifs.
- Ne pas utiliser un coffret dont les dates de péremption sont dépassées.
- Remettre immédiatement entre +2°C et +8°C, les réactifs non utilisés.

PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

- Les réactifs en solutions contiennent comme agent de conservation, de l'azide de sodium à une concentration <0.1% (w/v) ou du ProClin® 300 à 0.02% (w/v). Ne pas avaler et éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. L'azide de sodium peut former des mélanges explosifs lors de son élimination dans les canalisations de cuivre ou de plomb. Rincer abondamment lors de telles éliminations.
- Ne pas utiliser les réactifs si des signes de contaminations ou de modifications apparaissent.
- Le coffret **FIDIS™ Thyro** a été élaboré dans le respect des Directives européennes 67/548/CEE et 1999/45/CE en ce qui concerne la classification, l'emballage et l'étiquetage des préparations dangereuses.
- **FIDIS™ Thyro** a été optimisé pour les conditions opératoires précisées dans cette notice. Le non-respect des dilutions, de la préparation des réactifs, du protocole ou la substitution d'un réactif par un autre produit peuvent affecter les performances finales du test.
- *Les contrôles et le calibre sont d'origine humaine. Pour chacun, les recherches d'anticorps anti-HIV 1 et 2, anti-HCV et d'antigènes de l'hépatite B se sont révélées négatives. S'agissant de produits potentiellement infectieux, il est toutefois nécessaire de les manipuler avec les précautions d'usage.*

PRÉPARATION DU TEST

Préparation de l'unité de filtration FIDIS™

☞ Vérifier les tuyaux reliant la pompe au support et le réglage du manomètre (molette totalement fermée).

Utilisation du système d'analyse FIDIS™ et du logiciel MLX-BOOSTER

☞ Se reporter au Manuel d'utilisation fourni avec le système FIDIS™ pour effectuer les étapes de mise en route et de calcul. Pour toutes informations complémentaires et/ou résolution de problèmes, veuillez prendre contact auprès de bmd ou de votre distributeur.

1. Commencer la série comme indiquée dans le Manuel d'utilisation.
N.B : L'appareil met 30 minutes pour chauffer après l'avoir allumer. Un nouveau préchauffage est nécessaire après 4 heures d'inactivité du système.
2. Les étapes de calibration et de contrôles sont décrites dans le Manuel d'utilisation. Ces 2 étapes devront être exécutées régulièrement 1 fois/mois et à chaque nouveau lot de « Sheath fluid » afin d'assurer une performance optimale de l'appareil. L'étape de calibration doit également être effectuée si la température indiquée sur l'écran de la série du lot est en dehors de celle paramétrée.
3. Programmer un lot ou une série de lots multiples sur FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
4. Placer la microplaque dans le support de plaques du système FIDIS™ comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.

5. Effectuer l'analyse des résultats comme indiqué dans le Manuel d'utilisation.
6. A la fin de la dernière utilisation journalière de l'appareil, exécuter les opérations de lavage et de désinfection avant d'arrêter le système d'analyse conformément aux instructions d'arrêt décrites dans le Manuel d'utilisation.

Préparation des réactifs

☞ Ramener l'ensemble des réactifs à **température ambiante (+18°C/+25°C)** avant de les préparer extemporanément.

1. Préparation des échantillons et des contrôles

- Diluer les échantillons et les contrôles au **1/201** dans le tampon de dilution (**B1**).

Exemple : 10µl d'échantillon dans 2000µl de tampon de dilution (B1).

- **Agiter vigoureusement au vortex.**

2. Définition de la configuration du test

Utiliser la feuille de travail contenue dans le coffret pour noter la localisation des échantillons.

a. Prévoir systématiquement :

- ✗ 1 puits « blanc réactif »
- ✗ 1 puits pour le contrôle négatif
- ✗ 1 puits pour le contrôle positif
- ✗ 2 puits « calibrateur »

b. Détermination du nombre exact de puits nécessaires et de leur attribution.

Les schémas qui suivent donnent 2 exemples de configuration selon le nombre de puits nécessaires et la disponibilité en puits vierges. Le sens du dépôt doit s'effectuer systématiquement par colonne sans intercaler de puits vides.

Une même plaque peut être utilisée au cours de différents essais si les puits non utilisés sont protégés par des films pour microplaque. Un même puits ne peut être réutilisé plusieurs fois.

Afin d'éviter toute erreur dans ce sens, il est conseillé d'identifier les puits déjà usagés (voir exemple 2 ci-après).

c. Programmation du protocole d'analyses au niveau du FIDIS™

☞ Se reporter au manuel d'utilisation FIDIS™

« Programmation d'un batch ou d'un Multibatch. ».

Exemple 1 :

- la plaque est totalement vierge : l'attribution des puits débute en A1.

	1	2	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	E4	E12	E20							
B	Ctrl-	E5	E13	E21							
C	Ctrl+	E6	E14	E22							
D	Cal	E7	E15	E23							
E	Cal	E8	E16	E24							
F	E1	E9	E17	E25							
G	E2	E10	E18								
H	E3	E11	E19								

Exemple 2 :

- 16 puits ont déjà été utilisés : l'attribution des puits débute en A3.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blanc	E4	E12	E20	E28	E36	E44	E52		
B			Ctrl-	E5	E13	E21	E29	E37	E45	E53		
C			Ctrl+	E6	E14	E22	E30	E38	E46			
D			Cal	E7	E15	E23	E31	E39	E47			
E			Cal	E8	E16	E24	E32	E40	E48			
F				E1	E9	E17	E25	E33	E41	E49		
G				E2	E10	E18	E26	E34	E42	E50		
H				E3	E11	E19	E27	E35	E43	E51		

MODE OPÉRATOIRE

1. Distribution des microsphères

- Protéger les puits non utilisés avec des films plastiques (si nécessaire).
- Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits, **après avoir préalablement agité le flacon vigoureusement au vortex pendant 20s.**

REMARQUE :

- ⓘ Dans le cadre de l'utilisation de l'automate CARIS™, une sonication des microsphères de 5 minutes est préconisée.
- ⓘ Dans le cadre de l'utilisation d'un automate de dilution/répartition, les étapes 1 et 2 doivent être inversées :
⇒ distribuer le sérum dilué puis les microsphères

2. Incubation des échantillons

- Déposer 100µl de tampon de dilution (**B1**) pour le blanc réactif.
- Déposer 100µl de contrôles dilués, de calibrateur prêt à l'emploi et d'échantillons dilués.
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation en recouvrant la plaque et en évitant de la laisser sous la lumière directe.

3. Lavage 1

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 2 cycles successifs en tampon de lavage (**C1**) :

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration.
(vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- c. Distribuer 300µl de tampon de lavage (**C1**).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Distribuer 300µl de tampon de lavage (**C1**).
- f. Déclencher la pompe. Après aspiration totale du liquide, compter 5 secondes supplémentaires, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
Refermer le robinet « casse vide ».
- g. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base 10 fois sur du papier absorbant.

- h. Repositionner la plaque sur le laveur et filtrer à nouveau 5 secondes. Arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ».
- i. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- j. Placer ensuite la microplaque sur une surface totalement sèche avant de distribuer le conjugué.

4. Incubation du conjugué

- Déposer 100µl de conjugué
- Laisser incuber 30 minutes à température ambiante sans agitation, en recouvrant la plaque et en évitant de la placer sous la lumière directe. Le temps d'incubation débute après que le conjugué ait été ajouté à tous les puits. Si ce temps n'est pas respecté, les résultats pourront être erronés.

Remarque : le conjugué est sensible à la lumière
 ⇒ **Refermer le flacon après utilisation.**

5. Lavage 2

Laver la plaque en utilisant l'unité de filtration par 1 cycle en tampon de dilution (B1) :

Utiliser de préférence deux réservoirs à réactifs distincts pour les lavages 1 et 2.

Ou bien nettoyer et sécher correctement le réservoir entre les deux lavages afin de ne pas mélanger les deux tampons B1 et C1.

- a. Retirer le couvercle de la microplaque et la positionner sur l'unité de filtration. (vérifier que le robinet « casse vide » est en position fermée).
- b. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide par ouverture du robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
- c. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1).
- d. Déclencher la pompe. Dès la disparition totale du liquide, arrêter la pompe et supprimer rapidement le vide en ouvrant le robinet « casse vide ». Refermer le robinet « casse vide ».
- e. Retirer la microplaque du laveur et éliminer le tampon résiduel en tapant fortement sa base sur un papier absorbant.
- f. Distribuer 100µl de tampon de dilution (B1) et procéder à l'analyse de la microplaque.
 En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée **dans l'heure qui suit l'ajout de la solution** (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.

6. Analyse

☞ L'effectuer conformément au manuel d'utilisation FIDIS™ et MLX BOOSTER™.

CRITÈRES DE VALIDATION DES RÉSULTATS

Le calibrateur, les contrôles positif et négatif doivent être testés dans chaque série d'essai pour s'assurer que tous les réactifs et procédures ont été exécutés correctement.

Afin de valider les résultats, tous les critères énumérés ci-dessous doivent être rencontrés.

En cas de non-conformité d'un de ces critères, le test devra être considéré comme non valide et l'analyse devra être refaite.

- a. La valeur du contrôle positif doit être comprise dans les limites de celles indiquées sur les étiquettes des flacons correspondants.
- b. La valeur du contrôle négatif doit être inférieure à 130 UI/ml.

La solution de microspheres contient des billes témoins permettant de vérifier la présence de sérum dans les puits, ainsi que le bon déroulement du test. Un puits présentant un signal-réponse non conforme sera invalidé par le logiciel MLX BOOSTER™.

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Unités Internationales (UI/ml) pour les deux spécificités	< 130 UI/ml	130-150 UI/ml	> 150 UI/ml
Interprétation	Négatif	Limite ^(*)	Positif

(*) Les résultats limites doivent être contrôlés sur un second prélèvement et interprétés en fonction d'examen complémentaires et du contexte clinique.

Chaque laboratoire doit établir et conserver ses propres valeurs de plage (normale) de référence, en fonction de la population de patients et d'autres facteurs locaux.

CALCUL DES RÉSULTATS

☞ Les résultats sont automatiquement calculés par le logiciel MLX-BOOSTER™ et peuvent être imprimés pour chaque analyse.

LIMITES

Les sérums hémolysés, lipémiques, ictériques, présentant des taux élevés en IgG monoclonal, des complexes immuns ou des facteurs rhumatoïdes peuvent entraîner des résultats faussement positifs.

Les sérums de patients immunodéprimés donneront un résultat non valide.

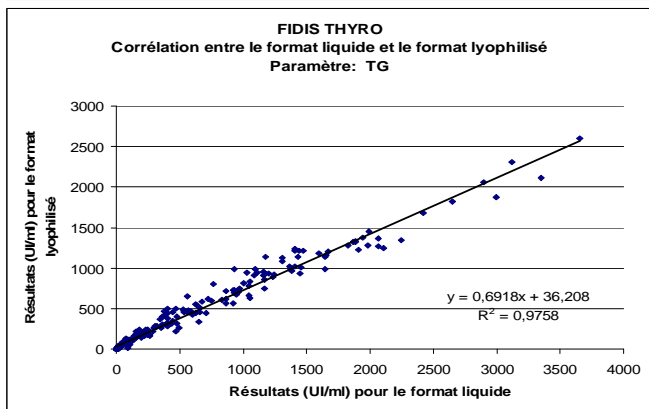
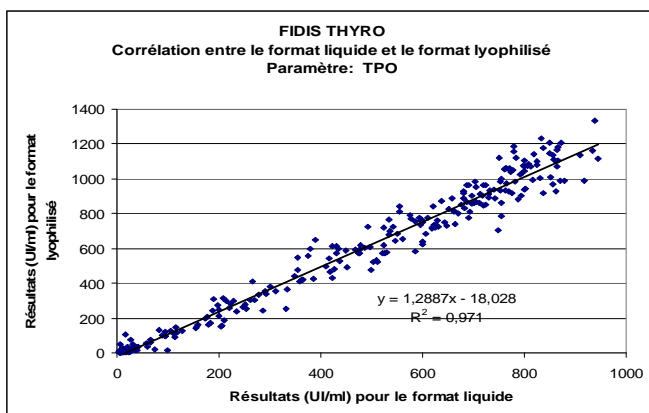
CONTRÔLE DE QUALITE

Il est conseillé d'utiliser des contrôles internes ou externes pour les différentes spécificités. Le contrôle multiparamétrique Immuno-Trol II (bmd, réf. : HM037) renferme des anticorps humains dirigés contre les antigènes thyroperoxydase (TPO) et thyroglobuline (TG), il est à tester de façon identique à celle des échantillons.

CARACTÉRISTIQUES ET PERFORMANCES DU TEST

CORRÉLATION

Les performances du coffret **FIDIS™ Thyro** (sous sa nouvelle forme lyophilisée) ont été comparées à celles de l'ancien coffret **FIDIS™ Thyro** (format liquide) sur une population de 271 échantillons. L'analyse de la courbe de régression linéaire montre que les deux produits sont équivalents.



FIDÉLITÉ DU TEST (FORMAT LYOPHILISÉ)

Spécificité antigénique	Intra-essai (10 tests dans le même essai)		Inter-essais (5 tests dans 5 essais différents)	
	Valeur moyenne (UI/ml)	CV (%)	Valeur moyenne (UI/ml)	CV (%)
Ag TPO	151	7,1	162	7,0
Ag TPO	366	3,0	219	12,0
Ag TPO	640	4,2	682	7,0
Ag TG	163	4,8	158	10,0
Ag TG	453	4,5	588	12,0
Ag TG	672	7,2	1044	8,0

SENSIBILITÉ, SPÉCIFICITÉ, CONCORDANCE PAR RAPPORT AUX AUTRES MÉTHODES

FIDIS™ Thyro a été comparé à deux coffrets commerciaux (A et B) basés sur une méthode ELISA pour la détection des anticorps anti-thyroperoxydase (TPO) et anti-thyroglobuline (TG).

L'ensemble des résultats discordants a été confirmé sur des autres coffrets (C et D).

L'étude a porté sur 247 échantillons :

- ⇒ 101 échantillons associés à la présence de maladies thyroïdiennes autoimmunes
- ⇒ 50 échantillons provenant d'individus sains
- ⇒ 96 échantillons présentant des marqueurs biologiques susceptibles de provoquer des interférences (cryoglobulinémie, hypergammaglobulinémie, immunoglobulines monoclonales IgG et IgM, complément, facteur rhumatoïde, complexes immuns).

Résultats

TPO	ELISA « A »	
	Positifs	Négatifs
FIDIS™	80	0
	Négatifs	3

Sensibilité relative 96,5 %
Spécificité relative 100 %
Concordance 98,8 %

TG	ELISA « B »	
	Positifs	Négatifs
FIDIS™	38	0
	Négatifs	3

Sensibilité relative 95,2 %
Spécificité relative 99 %
Concordance 98,4 %

Analyse des résultats discordants (7/247)

Spécificité antigénique	Résultat FIDIS™	ELISA A ou B	ELISA C ou D	Spécificités associées
TPO	négatif	faiblement positif	négatif	complément
TPO	négatif	faiblement positif	négatif	aucune
TPO	négatif	faiblement positif	négatif	hypergamma.
TG	négatif	positif	négatif	TPO
TG	négatif	positif	positif	TPO
TG	fortement positif	négatif	fortement positif	TPO
TG	positif	limite	négatif	aucune

⇒ Pour TPO, les résultats négatifs par FIDIS™ sont retrouvés négatifs par le test « C ». Deux correspondent à des interférences biologiques.

⇒ Pour TG, 2/3 résultats par FIDIS™ sont confirmés par le test « D ».

Mode de détermination du seuil de positivité

Estimé à partir des 146 échantillons issus des populations « individus sains » et « interférences biologiques » et par rapport aux standards 66/387 et 65/93.

Le seuil de positivité (150UI/ml) correspond au 100^{ème} percentile de la distribution des valeurs pour les 2 spécificités.

Le seuil de négativité (130UI/ml) correspond au 97^{ème} percentile pour les 2 spécificités.

Entre ces 2 seuils, les résultats sont considérés limites.

BIBLIOGRAPHIE

Meyer O., Rouquette A-M et Youinou P. « Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes » BMD Editions (1999).

Mcintosh R.S., Weetman A.P., Asghar M.S. « The antibody response in human autoimmune thyroid disease », Clin Sci, 1997, 92 (6), 529-41.

Spencer C.A., Takeuchi M., Kazarosyan M., Wang C.C., Guttler R.B., Singer P.A., Fatemi S., LoPresti J.S., and Nicoloff J.T. « Serum Thyroglobulin Autoantibodies: Prevalence, Influence on Serum Thyroglobulin Measurement, and Prognostic Significance in Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma », J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83 (4): 1121.













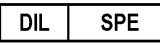

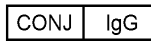

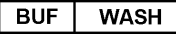




Feldt-Rasmussen U. « Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to peroxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor », Clin Chem, 1996, 42 (1), 160-3.

Bagis T, Gokcel A, Saygili ES. « Autoimmune thyroid disease in pregnancy and the postpartum period: relationship to spontaneous abortion », Thyroid, 2001, 11 (11): 1049-53.

SCHÉMA RÉCAPITULATIF DU MODE OPÉRATOIRE

	QUANTITÉ À DISTRIBUER	RÉACTIFS	CONDITIONS D'INCUBATIONS
Déposer 50µl de microsphères dans chaque puits			
Incubation des échantillons	100µl	Tampon de dilution (B1) : blanc réactif	30 min. Température ambiante
	100µl	Contrôle négatif dilué en tampon de dilution (B1)	
	100µl	Contrôle positif dilué en tampon de dilution (B1)	
	100µl	Calibrateur prêt à l'emploi (en double)	
	100µl	Echantillons dilués en tampon de dilution (B1)	
Lavage 1	Laver 2 fois au tampon de lavage (C1) (300µl/puits)		
Incubation du conjugué	100µl	Conjugué anti-IgG Prêt à l'emploi	30 min Température ambiante
Lavage 2	Laver 1 fois avec du tampon de dilution (B1) (100µl/puits)		
Lecture	<p>Ajouter 100µl/puits de tampon de dilution (B1) et analyser par insertion de la plaque dans le cytomètre de flux</p> <p><i>En cas de lecture différée, la plaque devra être analysée dans l'heure qui suit l'ajout de la solution (B1). Durant cette période, la plaque doit être conservée à température ambiante et protégée de la lumière directe.</i></p>		

LEGENDES DES SYMBOLES

	Risque Biologique		Conservé à		Numéro de catalogue
	Lire le manuel d'utilisation		Pour le diagnostic in vitro uniquement		Numéro de lot
	Nombre de tests		A utiliser avant		Déclaration de conformité CE
	Microplaque		Contrôle négatif		Microspheres
	Diluant échantillon		Contrôle positif		Conjugué IgG
	Calibrateur		Tampon de lavage		Tampon de reconstitution des microsphères
	Test FIDIS		Contient de l'azide de sodium		A reconstituer

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



FIDIS™ Thyro

REF

MX 002



INTENDED USE

The **FIDIS™ Thyro** kit is a quantitative homogeneous fluorescent-based microparticles immunoassay using flow cytometry readings. It is designed for the simultaneous detection of two antibodies directed against Thyroperoxidase (TPO) and Thyroglobulin (TG).

SUMMARY AND EXPLANATION

Auto-immune thyroid pathologies are characterised by the presence of autoantibodies directed, mainly, against 2 major antigens: Thyroperoxidase (TPO) and Thyroglobulin (TG).

One or the other, or both types of autoantibodies: anti-Thyroperoxidase (anti-TPO) and anti-Thyroglobulin (anti-TG) are found, in general, at average concentration in Basedow (or Graves's disease) and at higher levels in Hashimoto thyroiditis.

Pathology	Anti-TPO	Anti-TG
Hashimoto	99 %	85 %
Thyroid atrophy	99 %	85 %
Basedow / Graves	75 %	50 %
Healthy adults	4-8 % 15 % over 60	4-8 % 15 % over 60

Anti-TG are slightly less sensitive than anti-TPO and exceptionally found isolated; when faced with a negative anti-TPO in an auto-immune thyroiditis suspicion situation, the detection of anti-TG is highly recommended.

Furthermore, a recent study has illustrated a 100% increase of spontaneous abortion in women tested positive for anti-thyroid antibodies during the first 3 months of their pregnancy.

Anti-TG and anti-TPO are increased in 4 to 8% healthy individuals and even higher in women and individuals over 60. They are rather often increased in other Auto-Immune Diseases frequently without affecting the gland function.

ASSAY PRINCIPLE

FIDIS™ Thyro kit is based on the use of distinct uniform size color-coded microspheres and a benchtop flow cytometer interfaced to digital signal processing hardware and software. A red diode laser beam in the flow cytometer classifies each set of microspheres on the basis of its unique fluorescence intensity (red to orange) thus identifying which analyte is being tested. At the same time, a green laser beam illuminates the

external second molecule fluorescence to quantify the reaction related to the specific analyte.

Each antigen (recombinant TPO and human purified TG) required for the assay is covalently coupled to an individual set of microspheres through its surface functional groups. The different antigen coupled microspheres are mixed together constituting the final microspheres reagent.

The **FIDIS™ Thyro** kit allows to detect two specific antibodies: **anti-TPO and anti-TG antibodies**.

The test is performed in a 96 well microplate with a filtering membrane.

- In the first step, the sample is distributed in each well containing the microspheres mixture. If this sample contains one or more of the suspected antibodies, this(ese) antibody(ies) binds to the corresponding antigen(s) on the various sets of microspheres.
- After incubation, a wash step using a filtration process removes the unbound antibodies.
- A phycoerythrin labelled **anti-human IgG** conjugate is then added that binds to the previously bound antibodies.
- A final wash step allows to stop the reaction.
- The reaction is then directly measured by the flow cytometer, which differentiates each set of microspheres according to its fluorescence colour while simultaneously measuring the average fluorescence emitted by the conjugate.
- A calibration system allows the determination of the titer (IU/mL) of each sample by interpolation for each antigenic specificity.

The **FIDIS™ Thyro** kit could be used with **CARIS™** system (diluting and dispensing device).

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

- The test is performed on serum.
- Lipemic sera should be avoided, as well as samples which have been frozen and defrosted more than once.
- If the test is not run immediately, the samples should be stored at +2°C/+8°C for a maximum of 5 days, for longer storage, frozen undiluted samples at -20°C.
- To avoid non-specific binding, it is recommended to centrifuge and filter the cloudy samples or samples frozen for more than 6 months.

REAGENTS SUPPLIED

96 well microplate with filtering membrane and lid. MP	1 plate
Vial (A) of color-coded microsphere set sensitized by the one of both antigen(s): recombinant Thyroperoxidase (TPO) and human purified Thyroglobulin (TG). <u>Lyophilized</u> (to be reconstituted with the buffer named D) MICROSPHERES	Sq 6 mL
Vial (B1) of sample dilution buffer (white vial). <u>Ready to use</u> DIL SPE	2 x 115mL
Vial of calibrator* titered in international unit for the specificities to be measured. <u>Ready to use</u> CAL <i>Each titer is printed on the vial label</i>	1 x 1,5mL
Vial of positive control concentrated. This control has a standard reactivity, which provides evidence of the proper reagents activity and proper assay performance. <u>To be diluted</u> CONTROL + <i>Expected values are printed on the vial label.</i>	1 x 250µL
Vial of negative control concentrated. <u>To be diluted.</u> CONTROL -	1 x 250µL
Vial of anti-human IgG coupled to phycoerythrin <u>Ready to use</u> CONJ IgG	1 x 12mL
Vial (C1) of washing buffer (black vial) <u>Ready to use</u> BUF WASH	1 x 100mL
Vial (D) of reconstitution buffer for the microsphere set <u>Ready to use</u> BUF MICROSPHERES	1 x 6mL

Calibrator titer* (IU/ml) is standardized against International Reference 66/387 WHO for anti-Thyroperoxidase autoantibodies and international Reference 65/93 WHO for anti-Thyroglobulin autoantibodies.

ADDITIONAL MATERIAL – NOT SUPPLIED

- Precision pipettes capable of accurately delivering 5µL to 1000µL
- Multichannel Pipettes or dispensers capable of accurately delivering 40µL to 300µL or 5µL to 2 mL
- Vortex mixer
- Laboratory timer to monitor incubation steps
- Ultrasonic bath
- Absorbent towel
- Serological pipettes
- Microplate sealing films

STABILITY AND STORAGE

- Store reagents in their original packaging at +2°C to +8°C.
- Do not freeze reagents.
- Do not use kits beyond the expiration date.
- After use, store all components immediately back at +2°C to +8°C.

CAUTION

- Reagents in solution contain less of 0.1% (w/v) sodium azide and 0.02% (w/v) of Proclin® 300. Do not eat and avoid contact with skin and eyes. Azide can form explosive mixtures in copper or lead piping. Rinse thoroughly after flushing.
- Avoid to use reagents if signs of contamination or other visible changes occur.
- The **FIDIS™ Thyro** kit has been developed according to CE Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC regarding classification, packaging and labelling of dangerous preparations.
- The **FIDIS™ Thyro** kit has been optimized for use as described in this procedure. Do not substitute other manufacturer reagents. Dilution or alteration of these reagents may also alter the performance of the test. Follow thoroughly the test procedure to insure optimal performance.
- *Calibrators and controls are from human origin. The human sera used in the preparation of these products were tested and found non-reactive for antibodies to HIV-1, HIV-2, anti-HCV and Hepatitis B antigen. Because no test method can offer complete assurance that infectious agents are absent, handle as if capable of transmitting infectious diseases.*

TEST SET-UP

FIDIS™ Washer

- ☞ Check the tubing connecting the pump to the stand and the manometer setting (wheel completely closed).

Using FIDIS™ Analyzer and MLX-BOOSTER Software

- ☞ See the User's Manual provided with the **FIDIS™ Instrument** for detailed instructions on running the equipment and for calculation. For additional information and/or trouble shooting problems, please contact bmd subsidiaries or distributors.

1. Start the run as described in the User's Manual.
NOTE: The FIDIS™ takes 30 minutes to warm up after being turned on. A new warm up is necessary after 4 hours of system inactivity.
2. Calibration and controls are described in the User's Manual. Calibration and controls should be routinely performed once per month and each time a new lot of Sheath fluid reagent is used in order to insure optimal instrument performance.
Calibration should also be performed when the temperature is out of the determined range shown on the run batch screen.
3. Programming a batch or a multibatch of test protocol on the FIDIS™ as described in the User's Manual.
4. Load the microplate into the plate holder of the FIDIS™ as described in the User's Manual.

5. Analyze the results according the User's Manual.
6. When finished for the day, perform the sanitizing and soak operations, prior to turning the Analyzer off according to the shutting down procedure described in the User's Manual.

Reagents Preparation

☞ Remove the individual components from storage, allow them to warm up to **room temperature** (+18°C to +25°C), and mix them well.

1. Preparation of samples and controls.

- Dilute the samples and controls at **1:201** in dilution buffer (**B1**).
Ex.: 10µL sample in 2000µL dilution buffer (B1).
- **Vortex vigorously.**

2. Assay configuration

Use the work-sheet included in the kit to identify the location of the samples.

a. When setting up the test, systematically take into account the following well requirements: ⇒ See examples below

- ✗ 1 "reagent-blank" well
- ✗ 1 well for negative control
- ✗ 1 well for positive control
- ✗ 2 "calibrator" wells

b. Calculation of the correct number of wells necessary and their location.

In the following examples, 2 different configurations are described, according to the number of wells needed, and the availability of unused wells. The sample dispensing must be systematically carried out in a column. Do not leave empty wells.

The same microplate can be used for more than one serie of tests if unused wells are protected by microplate sealing film. Any single well can only be used once.

To avoid any error in using a well more than once, identify the used wells with a marker (see example 2 below).

c. Programming of the test protocol on the FIDIS™

☞ Refer to the FIDIS™ user's manual: "Creating a batch or a multi-batch".

Example 1:

- The microplate is totally blank (no well has yet been used): Use A1 as the 1st well.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	S4	S12	S20								
B	Ctrl-	S5	S13	S21								
C	Ctrl+	S6	S14	S22								
D	Cal	S7	S15	S23								
E	Cal	S8	S16	S24								
F	S1	S9	S17	S25								
G	S2	S10	S18									
H	S3	S11	S19									

Example 2:

- 16 wells have already been used: Use A3 as the 1st well.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Blank	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52		
B			Ctrl-	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53		
C			Ctrl+	S6	S14	S22	S30	S38	S46			
D			Cal	S7	S15	S23	S31	S39	S47			
E			Cal	S8	S16	S24	S32	S40	S48			
F			S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49			
G			S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50			
H			S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51			

ASSAY PROCEDURE

1. Microspheres dispensing

- Before to start the assay and if it is necessary, protect the unused wells with a microplate sealing film.
- **Vortex the microspheres reagent vigorously for 20s** and dispense 50µL in each well to be used.

PLEASE NOTE:

- ⓘ If CARIS™ is used, the microspheres should be sonicated for 5 minutes.
- ⓘ If a dispensing/diluting device is used (like CARIS™), the procedure steps 1 and 2 should be reversed: ⇒ dispense diluted sera in first and then, dispense microspheres

2. Addition and Incubation of the samples

- Dispense 100µL of sample dilution buffer (**B1**) for reagent blank.
- Dispense 100µL of prediluted controls, of ready to use calibrator and of prediluted samples.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature, away from direct sunlight and without shaking.

3. Wash step 1

Wash the plate 2 times with washing buffer (**C1**) using filtration unit:

- a. Remove the microplate lid (verify if the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed in totality and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- c. Dispense 300µL of washing buffer (**C1**) in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- e. Dispense 300µL of washing buffer (**C1**) in all the used wells.
- f. Start the pump. Stop it after 5 additional seconds when all the buffer has been removed and open the vacuum break valve. Close the vacuum break valve.
- g. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by tapping vigorously the plate 10 times on an absorbent towel.

- h. Place again the microplate on the washer and start the pump for 5 seconds. Stop it and quickly open the vacuum break valve.
- i. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting vigorously the plate on an absorbent towel.
- j. Place the plate on a totally dry surface before starting the conjugate incubation.

4. Incubation of the conjugate

- Dispense 100µL of ready to use conjugate in each well used.
- Cover the plate and incubate 30 minutes at room temperature away from direct sunlight and without shaking. The incubation time starts after the conjugate has been added to all wells. If this timing is not followed, the results might be erroneous.

Note : the conjugate is photosensitive.
 ⇒ After using, close the vial carefully.

5. Wash step 2

Wash the plate using the filtration unit on 1 cycle with dilution buffer **(B1)**.

Use two different reagent reservoirs for the 2 washing steps.
 Either clean and dry correctly the reservoir between both wash steps (avoid to mix both **B1** and **C1** buffers).

- a. Remove the microplate lid (verify that the vacuum break valve is closed) and place it on the washer.
- b. Start the pump. Stop it when the whole incubation liquid has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.
- c. Dispense 100µL of dilution buffer **(B1)** in all the used wells.
- d. Start the pump. Stop it when the whole buffer has been removed and open the vacuum break valve.
Close the vacuum break valve.
- e. Remove the microplate from the washer and remove the residual buffer by blotting the plate on an absorbent towel.
- f. Dispense 100µL of dilution buffer **(B1)** in all the used wells. Place the plate on a totally dry surface at room temperature.

The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight.

6. Reading of the test

☞ Follow the **MLX-BOOSTER™** and **FIDIS™** user's manual: Processing batches.

VALIDATION CRITERIA OF THE RESULTS

Calibrator, negative and positive controls have to be run with every batch of samples to ensure that all reagents and procedures performed properly.

In order to validate the results, all the criteria listed below must be met. Otherwise, the test is invalid and must be repeated.

- a. The positive controls should show a value within the limits printed on the corresponding vial labels.
- b. The negative controls should be less than 130 IU/mL.

The microsphere set contains Internal standard beads allowing to verify the presence of serum in wells, as well as the good respect of the test procedure. Wells presenting a not corresponding fluorescent signal will be no valid with **MLX BOOSTER™** software.

INTERPRETATION OF RESULTS

International Units (IU/mL) for the 2 specificities	< 130 IU/mL	130-150 IU/mL	> 150 IU/mL
Interpretation	Negative	Borderline ^(*)	Positive

() Borderline results should be repeated on a second sample and the interpretation of the results should be treated in the frame of additional testing and taking into account the clinical status of the patient.*

Each laboratory should establish and maintain its own references (normal) range values, based on the patient population and other local factors.

CALCUL OF RESULTS

☞ The results are automatically calculated by **MLX-BOOSTER™** software and can be printed for each assay.

LIMITATION

Hemolytic, lipemic, icteric samples or samples with abnormal concentration of IgG and/or complement levels or samples with rheumatoid factor may confound the results of this assay.

The serums from Immunodeficient patients will give a no valid result.

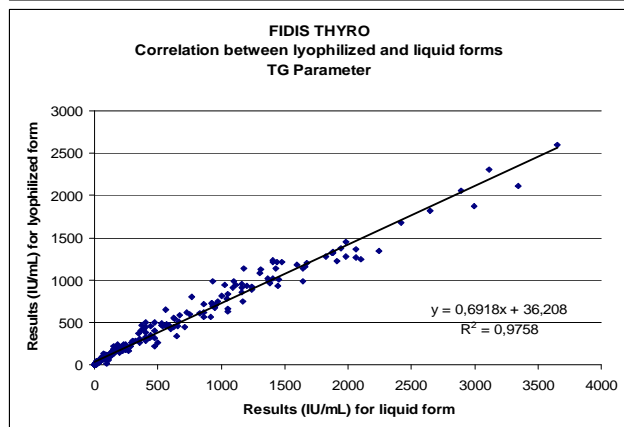
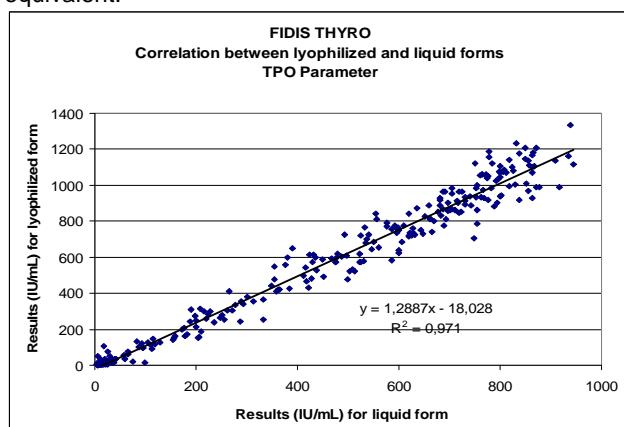
QUALITY CONTROL

It is recommended to use internally and externally sourced control material for the different specificities. Immuno-trol II multiparametric control (Cat.n: HM037) contains human auto-antibodies directed against Thyroperoxidase (TPO), and Thyroglobulin (TG) antigens. This material is to be assayed in the same manner as the unknown samples.

CHARACTERISTICS AND PERFORMANCES OF THE TEST

CORRELATION

The performances of **FIDIS™ Thyro**, lyophilized form were assessed on a population of 271 samples and compared to the performances of **FIDIS™ Thyro**, liquid form. A linear regression analysis of the two products showed that both are equivalent.



REPRODUCIBILITY / PRECISION (LYOPHILIZED FORM)

Specificity of antigen	Intra-Assay (10 tests in the same run)		Inter-Assays (3 tests in 6 different runs)	
	Mean Value (IU/mL)	CV (%)	Mean Value (IU/mL)	CV (%)
Ag TPO	151	7.1	162	7.0
Ag TPO	366	3.0	219	12.0
Ag TPO	640	4.2	682	7.0
Ag TG	163	4.8	158	10.0
Ag TG	453	4.5	588	12.0
Ag TG	672	7.2	1044	8.0

INDICATION OF THE DIAGNOSTIC VALUE IN COMPARISON WITH OTHER METHODS

FIDIS™ Thyro kit has been compared to 2 commercially kits (A and B) based on ELISA method for the detection of antibodies anti-thyroperoxidase (TPO) and anti-thyroglobulin (TG).

All discrepant results have been confirmed to 2 other ELISA kits (C and D).

The study was performed on 247 samples:

- ⇒ 101 samples related to autoimmune thyroid diseases
- ⇒ 50 samples from blood donors
- ⇒ 96 samples selected for their potential biological interferences (cryoglobulinemia, hypergammaglobulinemia, IgG and IgM monoclonal immunoglobulins, complement, rheumatoid factor, immune complexes).

Results

TPO		ELISA "A"	
		Positive	Negative
FIDIS™	Positive	80	0
	Negative	3	164

Relative sensitivity 96,5 %

Relative specificity 100 %

Relative accuracy 98,8 %

TG		ELISA "B"	
		Positive	Negative
FIDIS™	Positive	38	0
	Negative	3	164

Relative sensitivity 95,2 %

Relative specificity 99 %

Relative accuracy 98,4 %

Discrepant results analysis (7/247)

Antigenic specificity	FIDIS™ results	ELISA A or B	ELISA C or D	Specificity related
TPO	negative	weakly positive	negative	complement
TPO	negative	weakly positive	negative	none
TPO	negative	weakly positive	negative	hypergamma.
TG	negative	positive	negative	TPO
TG	negative	positive	positive	TPO
TG	strongly positive	negative	strongly positive	TPO
TG	positive	borderline	negative	none

⇒ For TPO negative results by FIDIS™ are also negative by the test "C". Two of them correspond to biological interferences.

⇒ For TG, 2/3 results by FIDIS are confirmed by the test "D".

Method for determining threshold values

Calculated on the 146 samples from «blood donors» and «biological interferences» populations and according standards 66/387 and 65/93.

The positive threshold (150IU/mL) corresponds to the 100th percentile of the values distribution for the 2 specificities.

The negative threshold (130IU/mL) corresponds to the 97th percentile for the two specificities.

Between these thresholds, results are considered borderline.

BIBLIOGRAPHY

Meyer O., Rouquette A-M et Youinou P. « Autoanticorps, Marqueurs des Maladies autoimmunes » BMD Editions (1999).

Mcintosh R.S., Weetman A.P., Asghar M.S. « The antibody response in human autoimmune thyroid disease », Clin Sci, 1997, 92 (6), 529-41.

Spencer C.A., Takeuchi M., Kazarosyan M., Wang C.C., Guttler R.B., Singer P.A., Fatemi S., LoPresti J.S., and Nicoloff J.T. « Serum Thyroglobulin Autoantibodies: Prevalence, Influence on Serum Thyroglobulin Measurement, and Prognostic Significance in Patients with Differentiated Thyroid Carcinoma », J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83 (4): 1121.













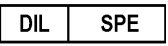

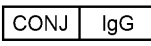

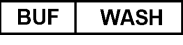
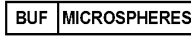



Feldt-Rasmussen U. « Analytical and clinical performance goals for testing autoantibodies to peroxidase, thyroglobulin, and thyrotropin receptor », Clin Chem, 1996, 42 (1), 160-3.

Bagis T, Gokcel A, Saygili ES. « Autoimmune thyroid disease in pregnancy and the postpartum period: relationship to spontaneous abortion », Thyroid, 2001, 11 (11): 1049-53.

SUMMARY OF THE TEST PROCEDURE

	VOLUME TO BE DISTRIBUTED	REAGENTS	INCUBATION CONDITIONS
Dispense 50µL of microspheres reagent in each well to be used			
Incubation of the samples	100µL	Dilution buffer (B1): reagent blank	30 min. Room temperature
	100µL	Diluted negative control in dilution buffer (B1)	
	100µL	Diluted positive control in dilution buffer (B1)	
	100µL	Ready-to-use Calibrator (in duplicate)	
	100µL	Diluted samples in dilution buffer (B1)	
Washing 1	Wash twice in washing buffer (C1) (300µL/well)		
Incubation of the conjugate	100µL	Ready to use Anti-IgG conjugate	30 min Room temperature
Washing 2	Wash 1 time in Dilution buffer (B1) (100µL/well)		
Reading	<p>Add 100µL/well of Dilution buffer (B1) and proceed immediately with the reading in FIDIS™ Instrument</p> <p>The reading must be doing in the hour following adding the solution (B1). During this time, keep the plate at room temperature away from direct sunlight</p>		

SYMBOLS USED

	Biological risk		Temperature limitation		Catalog Number
	Read instructions for use		In Vitro Diagnostic Use		Lot Number
	Number of tests		Use by		EC Declaration of Conformity
	Microplate		Negative control		Microspheres
	Specimen diluent		Positive control		IgG Conjugate
	Calibrator		Wash Buffer		Microsphere reconstitution buffer
	FIDIS test		Contains sodium azide		Reconstitute with

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

