



# SELco® anti-TPO MODE D'EMPLOI

100 Tests **REF** 1500  
Rév. 21.07.2005



## Dosage radioimmunologique des anticorps anti-thyroperoxydase dans le sérum

















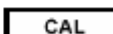

**MEDIPAN GMBH**

Ludwig-Erhard-Ring 3  
**15827 Dahlewitz / Berlin (Germany)**

...

Phone: +49(0)33 708 / 44 17 - 0  
Fax: +49(0)33 708 / 44 17 - 25

[info@medipan.de](mailto:info@medipan.de)  
[www.medipan.com](http://www.medipan.com)

IFU symbols radioactive assays MEDIPAN GMBH			
 IVD	Dispositif de diagnostic in vitro	 CE	Déclaration de conformité CE
 REF	Référence catalogue	 LOT	Numéro de lot
	Date de péremption		Fabriqué par
	Se référer aux documents		Consulter le mode d'emploi
	A stocker à		Risque biologique
	Composant radioactif		
 TRAC	Traceur	 BUF D	Tampon
 CONTROL	Contrôle sérum	 CAL	Standards
 PRE	Suspension de protéine A		

## INTRODUCTION

SELco anti-TPO est destiné au dosage ultra-sensible des anticorps anti-thyroperoxydase dans le sérum humain.

Les anticorps antimicrosomiaux sont des immunoglobulines circulantes dirigées contre un composant antigénique du réticulum endoplasmique des cellules folliculaires de la thyroïde. On a montré récemment qu'il y avait identité entre cet antigène et la peroxydase thyroïdienne (1). La présence d'anticorps antithyroperoxydase (TPO) dans le sérum est associée avec les principales maladies auto-immunes thyroïdiennes (maladie de Basedow et thyroïdite de Hashimoto). Ces anticorps appartiennent essentiellement à la classe des IgG et sont polyclonaux : 7 épitopes ont été identifiés jusqu'à présent sur la peroxydase thyroïdienne humaine, principalement sur le site catalytique de l'enzyme (2). Il semble que les anticorps anti-TPO impliqués dans les affections thyroïdiennes soient différents des anticorps décelables à faibles concentrations chez les sujets normaux ou chez des patients atteints de lupus érythémateux, d'anémie de Biermer ou d'autres maladies auto-immunes (3).

Dans les pathologies thyroïdiennes auto-immunes, les anticorps anti-TPO sont habituellement recherchés en parallèle avec les anticorps anti-thyroglobuline. L'un ou l'autre ou les deux types d'anticorps sont généralement présents à des concentrations moyennes dans la maladie de Basedow et à des taux plus élevés dans la thyroïdite de Hashimoto et ses variantes : thyroïdite lymphocytaire juvénile, thyroïdite fibreuse chronique, myxoedème idiopathique, thyroïdite atrophique silencieuse et syndrome de Schmidt. Selon le stade de l'atteinte auto-immune, ces maladies peuvent présenter un profil hormonal de type hyper-, hypo- ou même euthyroïdien. Les tests de détection d'anticorps sont donc indispensables pour confirmer l'origine auto-immune des symptômes. La recherche des anticorps anti-TPO est plus particulièrement recommandée en cas de (4) :

- suspicion clinique de maladie de Basedow en l'absence de signes thyroïdiens ou ophtalmiques,
- signes palpébraux évoquant une maladie de Basedow,
- suspicion d'hypothyroïdie chez l'adulte en présence ou non d'un élargissement de la glande,
- suspicion d'hypothyroïdie chez les enfants en âge de scolarité.

Des taux élevés en anticorps anti-TPO au **début** de la grossesse constituent un signe d'alerte pour la thyroïdite du post partum (5).

La recherche des anticorps anti-TPO devrait être entreprise systématiquement chez les sujets soumis à un traitement prolongé par un médicament contenant de l'iode, tel que l'amiodarone. Cette molécule est largement utilisée dans les arythmies cardiaques et l'angine de poitrine, elle contient 37,2 % d'iode et son élimination est extrêmement lente. On sait qu'elle est capable d'induire une

hypothyroïdie chez près de 20 % des patients vivant dans des régions où l'apport en iode est suffisant. Il est maintenant établi que ces hypothyroïdies iatrogènes sont beaucoup plus fréquentes chez les sujets porteurs d'anticorps anti-TPO. La recherche de ces anticorps s'effectuera donc **avant** le traitement et accompagnera un bilan thyroïdien complet (6).

De faibles concentrations d'autoanticorps thyroïdiens sont fréquemment décelées chez des sujets cliniquement et biologiquement euthyroïdiens, en particulier chez les femmes postménopausées. La signification exacte de ce phénomène n'est pas connue.

## PRINCIPE DU DOSAGE

SELco anti-TPO est un dosage radioimmunologique utilisant la technique des tubes revêtus. Des anticorps monoclonaux contre la thyroperoxydase humaine sont fixés sur la paroi des tubes et entrent en compétition avec les auto-anticorps présents dans les échantillons des patients pour les mêmes épitopes de la thyroperoxydase humaine recombinante marquée à l'iode 125 servant de traceur. Après une incubation de 90 minutes, l'excès de traceur et les complexes auto-anticorps – traceur présents dans la phase liquide sont éliminés par lavage. La radioactivité restant dans les tubes est mesurée dans un compteur gamma.

Le pourcentage maximal de liaison est mesuré en l'absence d'auto-anticorps dans l'échantillon puisqu'il n'y a alors aucune compétition et que les anticorps monoclonaux fixés à la paroi des tubes sont saturés par la thyroperoxydase marquée. En présence de quantités croissantes d'auto-anticorps dans les échantillons, la fraction de traceur capturé par les auto-anticorps augmente, diminuant ainsi le signal radioactif final. Par conséquent, la radioactivité mesurée (cpm) est inversement proportionnelle à la concentration en auto-anticorps qui peut être calculée à partir d'une courbe d'étalonnage (cpm ou %B/B<sub>0</sub>).

## ECHANTILLONS DES PATIENTS

### **Prélèvement et conservation des échantillons**

Le sang est prélevé par ponction veineuse. Après coagulation, le sérum est récupéré par centrifugation. Eviter d'utiliser des échantillons hémolysés ou lipidiques.

Les échantillons peuvent être conservés à 2 – 8 °C jusqu'à 3 jours. Pour un stockage prolongé, il est préférable de les stocker à –20 °C.

Eviter les congélations/décongélations répétées. Dans le cas d'utilisations multiples, aliquoter les échantillons et les stocker à –20 °C.

### **Préparation des échantillons avant le dosage**


Porter les échantillons à température ambiante et mélanger.  
Attention : ne pas diluer les échantillons

## Composition du kit pour 100 dosages

**A** Tubes revêtus d'anticorps monoclonaux – Porter les tubes à T° ambiante dans leur emballage d'origine avant utilisation 2 x 50 tubes prêts à l'emploi

CT


**D1** Traceur (125I-thyroperoxydase humaine recombinant) – A reconstituer avec 14 ml de BUFD. Reconstituer le contenu d'un flacon de D1 avec 5 ml de BUFD. Attendre 10 minutes pour obtenir une dissolution complète. Transférer cette solution dans le reste de BUFD et réétiqueter la bouteille de BUFD avec l'étiquette D2 fournie. 2 flacons lyophilisés



< 41 kBq par flacon

TRAC

**D2** Etiquettes pour le traceur reconstitué, 14 ml. Après reconstitution, le traceur est stable 1 mois à 2-8°C dans l'intervalle de la durée de vie du coffret. 2



TRAC

**J** Tampon pour la reconstitution des composants D1. 2 flacons, 14 ml prêts à l'emploi

BUF D

**B** Tampon de lavage (concentré pour 500 ml). Ajouter 480 ml d'eau distillée pour obtenir un volume final de 500 ml 1 flacon, 20 ml

WASHB

**0** Calibrateur 0 1 flacon de 0,2 ml de sérum, prêt à l'emploi

CAL

**1 - 5** Calibrateurs anti-TPO (sérum humain). Concentrations : 8, 40, 200, 1000 et 7500 U/ml 5 flacons de 0,2 ml de sérum chacun, prêts à l'emploi

CAL

**CI - CII** Sérums de contrôle anti-TPO (sérum humain). Concentrations : se reporter à la fiche jointe 2 flacons de 0,2 ml chacun, prêts à l'emploi

CONTROL

## Format et conservation

SELco anti-TPO a été conçu pour 100 déterminations. Il permet l'analyse de 42 échantillons inconnus, la réalisation de la gamme d'étalonnage et la détermination des contrôles en double.

La date de validité de chaque réactif est indiquée sur l'étiquette correspondante et rapportée sur l'étiquette du coffret.

A réception du coffret, tous les composants du SELco anti-TPO doivent être conservés à 2 – 8 °C, de préférence dans son emballage d'origine.

## Préparation avant l'emploi

Porter tous les composants du kit à température du laboratoire avant utilisation pour le dosage.

<h2>PROTOCOLE DE DOSAGE</h2>
------------------------------

Il est recommandé de travailler en duplicat.

1. Numérotter les tubes (A) de façon appropriée.
2. Distribuer dans les tubes correspondants au schéma du dosage :
  - 20 µl de calibrateurs
  - 20 µl de sérums de contrôle
  - 20 µl des échantillons sériques non dilués des patients
3. Ajouter 250 µl de traceur (D2) dans tous les tubes, y compris ceux pour la **radioactivité totale (tubes T)**. Les tubes T sont maintenant à mettre de côté jusqu'à la mesure de la radioactivité.
4. Incuber 90 minutes à température ambiante sous agitation.
5. Ajouter 2 ml de solution de lavage préparée à partir de B dans chaque tube.
6. Aspirer le surnageant complètement ou décanter. Pour éliminer les gouttelettes résiduelles, laisser reposer les tubes retournés (5 à 10 minutes) sur du papier absorbant en tapotant légèrement.
7. Mesurer la radioactivité de tous les tubes y compris des tubes T. Temps de comptage recommandé : 1 minute.

## CALCUL DES RÉSULTATS

Pour de meilleurs résultats nous recommandons d'utiliser une transformation log/log.

La courbe d'étalonnage est établie en reportant les valeurs moyennes en cpm des calibrateurs 0 – 5 en ordonnée (axe y, échelle logarithmique) en fonction des valeurs respectives des concentrations en anti-TPO en abscisse (axe x, échelle logarithmique).

Les concentrations en anti-TPO des contrôles et des échantillons inconnus sont déterminées directement en U/ml à partir de leur valeur respective en cpm.

Les valeurs correspondantes des pourcentages de liaison B en relation avec l'activité totale B/B<sub>0</sub> (%) peuvent être également utilisées pour construire la courbe d'étalonnage.

SELco anti-TPO peut être interprété à l'aide d'un logiciel adapté utilisant un mode de lissage spline compatible avec les dosages radioimmunologiques.

Il ne faut en aucun cas extrapoler à partir de la courbe d'étalonnage des concentrations en anti-TPO supérieures à 7500 U/ml (calibrateur 5). Pour mesurer de telles concentrations, il est indispensable de diluer les échantillons avec un sérum de patient négatif. Utiliser une dilution 1:20 (v/v).

### Exemple de courbe d'étalonnage

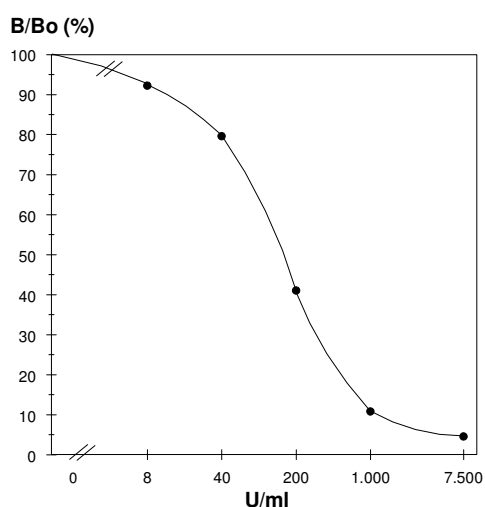
(approximativement 4 semaines avant la date d'expiration)

**A ne pas utiliser lors des tests !**



tubes	cpm (a)	cpm (b)	cpm moy.	B/B <sub>0</sub> (%)	U/ml
Radioactivité totale <b>T</b>	30553	30344	30449		
Standard <b>0</b>	16995	17415	17205	100	<b>0</b>
Standard <b>1</b>	16042	15672	15857	92,2	<b>8</b>
Standard <b>2</b>	13540	13860	13700	79,6	<b>40</b>
Standard <b>3</b>	6864	7274	7069	41,0	<b>200</b>
Standard <b>4</b>	1944	1784	1864	10,8	<b>1000</b>
Standard <b>5</b>	736	818	777	4,5	<b>7500</b>
Contrôle <b>I</b>	---	---	---	---	---
Contrôle <b>II</b>	---	---	---	---	---
Patient 1	5379	5486	5433	31,6	<b>290</b>

## Exemple de courbe d'étalonnage



## VALEURS DE REFERENCE

SELco anti-TPO	
Anticorps anti-TPO négatifs	< 40 U/ml
Anticorps anti-TPO zone grise	40 à 50 U/ml
Anticorps anti-TPO positifs	≥ 50 U/ml

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs normales et pathologiques. De ce fait, les valeurs ci-dessus sont données uniquement à titre indicatif. Plus de 90% des cas de maladies thyroïdiennes auto-immunes sont associés à des anti-TPO positifs. Dans la maladie de Basedow active, la proportion de valeur positive dépasse 70%. Des patients atteints de thyroïdite de de Quervain, les taux d'anti-TPO sont normaux. Des valeurs faibles en anti-TPO indiquent une atteinte auto-immune même en l'absence de toute anomalie de la fonction thyroïdienne silencieuse ou symptomatique.

## DONNEES ANALYTIQUES

### Calibration

La trousse SELco anti-TPO est calibrée contre le sérum de référence 66/387 du NIBSC.

### Parallélisme des standards et des échantillons sériques

Des tests de dilution peuvent être effectués en diluant des échantillons positifs dans du sérum ne contenant pas d'anticorps anti-TPO. Toutefois, en raison de la nature hétérogène de la population d'anticorps dans le sérum humain et au vu de la spécificité et la sensibilité des épitopes des anticorps, les résultats obtenus peuvent ne pas correspondre aux valeurs théoriques attendues.

## Spécificité

La grande pureté du traceur ( $^{125}\text{I}$ - TPO) et la spécificité des anticorps monoclonaux permettent de garantir que seuls les anticorps anti-TPO vont réagir et qu'aucune réaction croisée avec les anticorps anti-thyroglobuline et anti-TSH récepteur n'est possible.

## Sensibilité (limite de détection)

La sensibilité analytique de la trousse est d'environ 6 U/ml.

La définition la plus appropriée et statistiquement acceptable de la concentration minimale détectable de tout dosage est à présent la sensibilité fonctionnelle du dosage.

La sensibilité fonctionnelle représente généralement la concentration la plus faible pour laquelle la répétabilité (précision intra-essai) est de 10% et la reproductibilité (précision inter-essai) est de 20%. Dans des conditions correctes d'utilisation du SELco anti-TPO, la limite de sensibilité se situe à 30 U/ml.

En conséquence, les valeurs d'anti-TPO inférieures à ce seuil ne répondent pas aux critères statistiques de fiabilité définis par les bonnes pratiques de laboratoire, et ne peuvent pas être distinguées du zéro avec une précision statistique suffisante.




## Limites de la méthode

Aucun diagnostic ne doit être basé uniquement sur les résultats d'une méthode de diagnostic *in vitro*.

## PROTOCOLE RESUME

1	Numéroter les tubes A	CAL 0 – 5	CI - CII	Patient 1, 2 etc.	T
2	Distribuer Calibrateurs 0 - 5	20 µl	20 µl	20 µl	
	Contrôles I - II				
	Echantillons				
3	Pipeter le traceur D2	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
4	Incuber sous agitation	90 minutes à température ambiante			
5	Distribuer le tampon de lavage préparé à partir de B	2 ml	2 ml	2 ml	
6	Décanter ou aspirer le surnageant	Laisser les tubes retournés sur du papier absorbant (pendant 5 - 10 minutes)			
7	Comptage de la radioactivité	Temps de comptage : 1 minute			

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Ce coffret est destiné uniquement à un usage *in vitro*. Suivre attentivement les instructions d'utilisation.
- Respecter les dates d'expiration sur les étiquettes.
- Ne pas utiliser ou mélanger des réactifs de différents lots.
- Ne pas utiliser des réactifs d'autres fabricants.
- Eviter les temps morts durant la distribution des réactifs.
- Tous les réactifs doivent être stockés à 2 – 8 °C dans l'emballage d'origine avant toute utilisation.
-  • Certains des réactifs contiennent de faible quantité d'azoture de sodium (< 0,1%). Ils ne doivent pas être avalés ou mis en contact avec la peau ou les muqueuses.
-  • Les produits d'origine humaine ont subi un dépistage négatif vis-à-vis des anticorps anti-VIH, anti-VHC et de l'antigène HBS. Toutefois, aucun test de laboratoire ne peut garantir l'absence de ces agents viraux. Les réactifs comme les échantillons doivent donc être manipulés comme des produits potentiellement infectieux.
-  • Les réactifs radioactifs ne peuvent être vendus qu'à des personnes habilitées à manipuler des substances radioactives, en respectant les règles de base de protection contre les rayonnements ionisants :
  - Ne pas fumer, manger ou boire lors de la manipulation de produits radioactifs.
  - Toujours utiliser des gants de protection.
  - Ne jamais pipeter les solutions radioactives avec la bouche.
  - Chaque contamination ou perte de substance radioactive se fera en accord avec les réglementations en vigueur.
  - Nettoyer rapidement les substances radioactives renversées et bien laver la surface contaminée avec un décontaminant.