



TPO Orkit®

TPO-100

Trousse pour le dosage des autoanticorps anti-thyroperoxidase IgG dans le sérum humain

Revision: Janvier 2002

Dénomination

TPO Orkit® est la marque déposée par Labodia pour une méthode immuno-enzymatique de détection quantitative dans le sérum humain des autoanticorps (IgG) dirigés contre la peroxidase thyroïdienne.

Champ d'application

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 peroxidase thyroïdienne (1). La présence d'anticorps antithyroperoxidase (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 peroxidase 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 de la méthode

TPO Orkit® est un test basé sur le principe des dosages immuno-enzymatiques : la peroxidase thyroïdienne humaine (recombinante) est fixée sur des microcupules en polystyrène. Les sérums à tester sont dilués et distribués dans les cupules. Au cours d'une première incubation, les anticorps anti-thyroperoxidase, s'ils sont présents, se fixent spécifiquement aux cupules.

Après lavage, un anticorps anti-IgG humaines conjugué à la peroxidase de raifort se lie aux immunoglobulines précédemment retenues sur la phase solide.

Au terme d'une seconde incubation, la fraction non liée est éliminée par la-vage, puis la présence de l'enzyme est révélée par un substrat chromogène. La densité optique de l'échantillon est déterminée par lecture à 450 nm sur un lecteur de microplaques après addition d'une solution d'arrêt : la valeur obtenue est comparée à la densité optique fournie par des étalons de concentrations connues en anticorps anti-TPO.

Composition de la trousse

TPO Orkit® (96 microcupules), n° de catalogue TPO-100.

Chaque trousse contient :

- R1** Microcupules en polystyrène revêtues de peroxidase thyroïdienne; douze barrettes sécables de 8 cupules avec cadre de fixation.
- R2** Conjugué TPO anti-IgG : 1 x 11 ml. Anticorps de lapin anti-IgG humaines, conjugué à la peroxidase de raifort. Code couleur: ROUGE. Conservateur : 0,01% de bromo-nitro-dioxane.
- R3** Etalons TPO : 5 x 1 ml chacun contenant des anticorps anti-TPO dans du sérum humain dilué aux concentrations nominales suivantes : 0,30, 90, 300 et 1'000 UI/ml. Calibration : sérum de référence 66/387 (NBSB) Conservateur : 0,01 % de bromo-nitro-dioxane Code couleur : ROUGE
- R4** Contrôle positif TPO: 1 x 1 ml contenant des anticorps anti-TPO dans du sérum humain dilué ; les limites de concentration acceptables figurent sur l'étiquette. Conservateur : 0,01 % de bromo-nitro-dioxane.
- R5** Diluant : 1 flacon de 85 ml contenant de l'albumine bovine en tampon Tris. Conservateur : 0,01% de bromo-nitro-dioxane. Code couleur : ROUGE.
- OR1** Tampon de lavage concentré : 1 flacon de 13 ml contenant du tampon Tris. Concentré 30 x. Conservateur : 0,01% de bromo-nitro-dioxane.
- OR2** Substrat chromogène : 1 flacon de 11 ml contenant de la 3, 3', 5, 5' - tétraméthylbenzidine (TMB).
- OR3** Solution d'arrêt : 1 flacon de 11 ml contenant de l'acide sulfurique 1N.

Matériel supplémentaire

- Eau distillée ou désionisée.
- Micropipettes de précision, 10 µl et 1000 µl.
- Micropipettes ou micropipettes multicanaux automatiques ou semi-automatiques, 100 µl.
- Dispenseur mono ou multicanaux de 300 µl.
- Flacon de 500 ml.
- Tubes à usage unique en polystyrène (12 x 75 mm) pour la dilution des échantillons.
- Lecteur de microplaques réglé à 450 nm.

Précautions et avertissements

- Pour usage diagnostic *in vitro*.
- Ne pas mélanger des réactifs de lots différents.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de leur date d'expiration.
- Ne pas exposer les réactifs, en particulier le substrat chromogène, à une lumière vive pendant le stockage et les périodes d'incubation.
- Proscrire tout pipetage à la bouche.
- Eviter soigneusement toute contamination microbienne des réactifs lors de l'ouverture des flacons ou lors de prélèvements dans les solutions mères.
- Respecter le nombre de cycles de lavage.
- Une fois l'analyse commencée, toutes les étapes doivent être menées à leur terme sans interruption, en respectant les temps d'incubation prescrits.
- Vérifier que le substrat chromogène est incolore avant de le distribuer.
- Eviter tout contact entre ce réactif et des agents oxydants.
- Eviter tout contact de l'acide sulfurique (solution d'arrêt) avec la peau et les muqueuses. En cas d'éclaboussures, laver immédiatement à l'eau.

Avertissement : risque biologique

Certains réactifs de cette trousse contiennent du sérum humain. Ce sérum a été testé quant à l'absence d'anticorps anti-VIH, d'anticorps anti-hépatite C et d'antigène HBs avec des trousse agrées. Néanmoins, comme il n'existe actuellement aucune méthode d'analyse permettant d'exclure totalement qu'un dérivé du sang humain soit capable de transmettre l'hépatite, le virus VIH ou toute autre infection virale, ces réactifs doivent être manipulés avec les précautions habituellement observées pour des échantillons présentant un risque biologique.

Collecte et conservation des échantillons

Cette trousse a été mise au point pour le dosage des Ac anti-TPO dans le sérum. Les échantillons seront conservés entre +2° C et +8° C pendant 24 heures. Si le test ne peut être réalisé dans ce délai, les échantillons seront congelés à -10° C et pourront être conservés plusieurs mois.

Préparation des réactifs et dilution des échantillons

Procéder aux étapes suivantes avant de commencer l'analyse.

1. Tampon

Verser le contenu du flacon dans un cylindre gradué de 500 ml. Porter le volume à 400 ml avec de l'eau déminéralisée. Transférer la solution dans un flacon plastique étiqueté "Tampon Orkit" et conserver à 2-8 °C.

2. Dilution des échantillons

Diluer chaque échantillon à tester avec le Diluant dans des tubes à usage unique :

- 10 µl d'échantillon à tester + 1 ml de Diluant.
- Mélanger soigneusement.

3. Microcupules

La plaque de microtitration est composée de 12 barrettes sécables de 8 cupules. Chaque échantillon, contrôle, étalon ou blanc occupera l'une de ces cupules. Calculer le nombre de cupules nécessaires (voir plus loin). Sortir la plaque de son emballage et prélever les barrettes en pressant doucement le fond des cupules. Couper une barrette si nécessaire. Fixer les cupules nécessaires au dosage sur le cadre et replacer les cupules restantes avec le dessiccant dans la pochette fournie avec la trousse. Refermer l'emballage et conserver à 2-8 °C.

Stockage et délai de validité des réactifs

Conserver tous les réactifs à 2-8 °C. Les réactifs doivent être utilisés avant la date de péremption et NE PEUVENT PAS ETRE CONGELES.

Mode opératoire

1. Placer la trousse à température ambiante pendant 30 minutes.
2. Fixer un nombre approprié de cupules dans le cadre de la plaque. La conception de cette trousse permet également de doser en parallèle les anticorps anti-thyroglobuline et anti-TPO. Dans ce cas, fixer sur le même cadre un nombre égal de cupules ATG et TPO. Les Diluants des trousse ATG et TPO ont une composition identique avec un code couleur distinct. Il est donc possible d'effectuer les deux dosages sur la même dilution d'un échantillon.

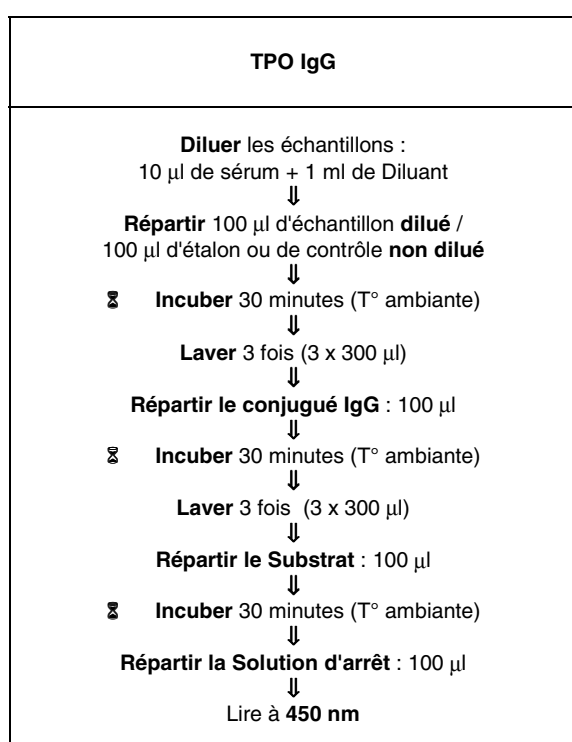
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BI	BI	S2	S2								
B	A	A	S3	S3								
C	B	B	S4	S4								
D	C	C	S5	S5								
E	D	D										
F	E	E										
G	C+	C+										
H	S1	S1										

BI : blanc - réactifs
A-E : Etalons TPO (non dilués)
C+ : Contrôle positif TPO (non dilué)
S1-S5 : Sérums à tester dilués 1:100

3. Répartition des échantillons et des étalons.
 - Distribuer 100 µl d'étalons A-E dans les cupules correspondantes en commençant par les cupules 1B et 2B.
 - Distribuer 100 µl de Contrôle Positif dans les cupules 1G et 2G.
 - Distribuer 100 µl de chaque échantillon dilué 1 : 100. Utiliser une pointe à usage unique pour chaque échantillon.
 - Chaque puits doit contenir 100 µl d'échantillon, de contrôle ou de calibrateur à l'exception des puits 1A et 2A qui serviront de blancs-réactifs.
4. Recouvrir les cupules et incubé **30 minutes** à température ambiante.
5. Eliminer la phase liquide des cupules par inversion ou par aspiration et distribuer **300 µl** de Tampon Orkit® dans chaque cupule. Rejeter le liquide de lavage par inversion ou par aspiration. Retourner les cupules sur du papier absorbant et sécher. Répéter l'opération **deux fois**. Eviter la formation de bulles d'air dans les cupules. Après le dernier lavage, sécher à fond sur papier absorbant.
6. Distribuer 100 µl de Conjugué dilué dans chaque cupule (blancs compris). Couvrir et incubé **30 minutes** à température ambiante.

7. Effectuer un nouveau cycle de 3 lavages dans les conditions décrites précédemment.
8. Régler une minuterie sur 30 minutes, distribuer **100 µl** de **Substrat chromogène** en déclenchant la minuterie au moment de la distribution dans la première cupule. Garder un rythme soutenu pendant toute la distribution.
9. Incuber **30 minutes** à température ambiante. Une coloration bleue se développe très rapidement.
10. Distribuer **100 µl** de **solution d'arrêt** dans toutes les cupules (blancs compris) en conservant le même rythme que pour l'étape 8. Homogénéiser en agitant doucement les cupules. La coloration vire du bleu au jaune.
11. Lire l'absorbance de chaque cupule à 450 nm. La lecture s'effectue contre les blancs-réactifs (cupules 1A et 2A).

Résumé du mode opératoire

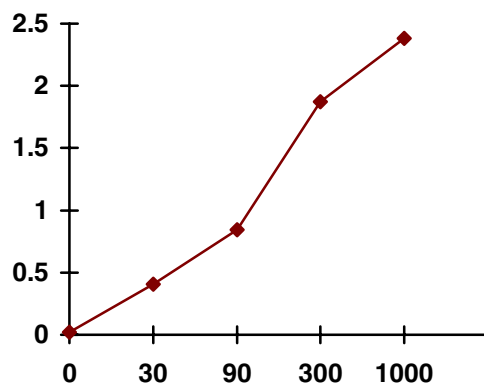


Résultats

- Calculer la moyenne des DO pour chaque paire de cupule (étalons et échantillons).
- Construire sur du papier semi-logarithmique ou millimétré une courbe d'étalonnage en portant en ordonnée les DO des étalons et leurs concentrations en abscisse.
- En fonction de la DO de chaque échantillon, lire directement la concentration **sans appliquer de facteur de dilution**.
- Les échantillons dont les concentrations sont supérieures à 1000 UI/ml doivent être dilués avec le Diluant de la trousse et redosés. On tiendra alors compte du facteur de dilution dans le calcul de la concentration finale.

Exemple:

DO



Concentration (unités internationales/ml)

Interprétation des résultats

- Les échantillons dont la concentration est inférieure à 20 UI/ml sont considérés comme négatifs.
- Les échantillons dont la concentration est comprise entre 20 UI/ml et 30 UI/ml sont considérés comme équivoques.
- Les échantillons dont la concentration est supérieure à 30 UI/ml et inférieure ou égale à 40 UI/ml sont considérés comme faiblement positifs.
- Les échantillons dont la concentration est supérieure à 40 UI/ml sont considérés comme positifs.

Contrôle de qualité

- Afin de valider la manipulation, le Calibrateur zéro doit impérativement avoir une densité optique inférieure ou égale à 0,600.
- Le Contrôle Positif de la trousse doit fournir une valeur comprise dans les limites acceptables mentionnées sur l'étiquette.

Limites du test

- Les anticorps anti-TPO sont de nature polyclonale et peuvent être polymorphes, même sur le plan individuel. Un certain degré de réaction croisée entre anticorps anti-thyroglobuline et anticorps anti-thyroperoxidase est inévitable car certains épitopes de la peroxidase thyroïdienne sont très semblables à des déterminants antigéniques présents à la surface de la thyroglobuline. Néanmoins, les réactions croisées observées avec cette trousse sont très faibles et permettent la distinction entre des échantillons présentant de faibles taux d'anticorps anti-TPO accompagnés de taux élevés d'anticorps anti-thyroglobuline et des échantillons contenant des concentrations élevées des deux types d'anticorps.
- La signification clinique d'une faible concentration d'anticorps anti-TPO reste controversée. Chez les sujets atteints d'une véritable pathologie thyroïdienne autoimmune, l'élévation des anticorps anti-TPO est généralement accompagnée d'une augmentation des anticorps anti-thyroglobuline. Il est donc conseillé de doser les deux types d'anticorps en parallèle.

Performances

- Sensibilité

Dose minimale détectable : 2 UI/ml

Précision

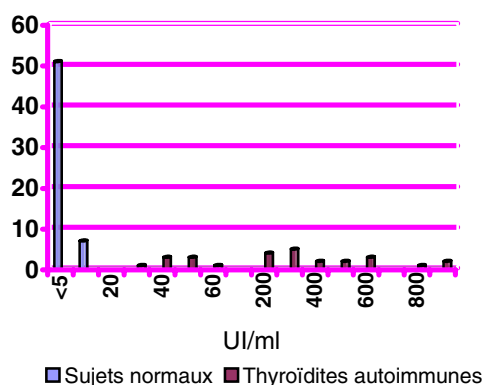
r = 12	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Concentration moyenne (IU/ml)	48	124	234
Ecart-type (IU/ml)	3,14	4,48	21,5
Coefficient de variation (IU/ml)	6,5	3,6	9,3

Reproductibilité

n = 8	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 3
Concentration moyenne (IU/ml)	48	161	292
Ecart-type (IU/ml)	4,9	23,6	50,2
Coefficient de variation (IU/ml)	10	14	17

Valeurs attendues

Anticorps anti-TPO chez 58 sujets normaux et chez 26 patients atteints de pathologies thyroïdiennes autoimmunes



References bibliographiques

1. Czarnocka B., Ruf J., Ferrand M., Carayon P., Lissitzky S. Purification of the human thyroid peroxidase and its identification as the microsomal antigen involved in autoimmune thyroid diseases. *FEBS Lett* 190 : 47 - 52 (1985).
2. De Groot L. J. Heterogeneity of human autoantibodies to TPO. In Carayon P. and Ruf J. (eds) : *Thyropoxidase and Thyroid autoimmunity. Colloque INSERM*, vol. 207, John Libbey, London, pp. 177 - 182 (1990)
3. Kohno Y., Naito N., Yamaguchi F. et al. Autoantibodies inhibiting thyroid peroxidase antibodies in healthy subjects and patients with systemic lupus erythematosus. In Carayon P. and Ruf J. (eds) : *Thyropoxidase and Thyroid autoimmunity, colloque INSERM*, vol. 207, John Libbey, London, pp. 215 - 223 (1990).
4. Volpé R. : *Autoimmunity in thyroid disease*. In Volpé R. (ed) : *Autoimmunity in Endocrine Diseases*. Marcel Dekker, New York, pp. 109 - 285 (1985).
5. Jansson R., Bernander S., Karlsson A., Levin K. and Nilson G. Autoimmune thyroid dysfunction in the post partum period. *J Clin Endocr.* 58 : 681 (1984).
6. Martino E., Safran M., Aghini-Lombardi F. and al. Environmental iodine intake and thyroid dysfunction during chronic amiodarone therapy. *Ann Intern Med* 101 : 28 (1984).

Pour plus d'information, contacter :

LABODIA S.A
Case postale 48
CH - 1137 Yens
Suisse

☎ + 41 (0) 21 800 34 84
☎ + 41 (0) 21 800 34 49

e-mail: info@labodia.com
Site internet : www.labodia.com