



# Anticorps anti-thyroglobuline (Tg) ELISA

IVD

## ENCART DU PRODUIT

REF 38099 Anticorps Thyroglobuline (Tg) ELISA 96 Tests

### USAGE PRÉVU

Technique de dosage immunoenzymatique de type ELISA, destinée à la détection qualitative et à la quantification des auto-anticorps contre la thyroglobuline dans le sérum humain, destinée à fournir un support dans le diagnostic de certaines troubles thyroïdiens – *thyroïdite d'Hashimoto, maladie de Graves* et goitre non-toxique.

### RÉSUMÉ ET EXPLICATION

Le spectre clinique des désordres thyroïdiens autoimmuns est large et le patient affecté peut être soit de type hyper, hypo ou même euthyroïdien. Il existe deux formes principales de désordres thyroïdes autoimmuns, *la maladie de Graves-Basedow et la thyroïdite de Hashimoto*. Des réactions thyroïdiennes autoimmunes peuvent également se manifester dans d'autres anomalies thyroïdiennes telles que le goitre sporadique et endémique, la maladie de Plummer et ophtalmopathie endocrinienne<sup>1-5</sup>.

Les patients qui présentent de telles maladies sont souvent associés à la présence d'auto-anticorps aux antigènes de la peroxydase thyroïdienne (TPO) et de la thyroglobuline. La thyroglobuline (Tg) est une glycoprotéine homodimérique 660 kD qui fonctionne comme une prohormone thyroïdienne. La TPO est une enzyme liée à la membrane de 105 kD qui catalyse la biosynthèse de l'hormone thyroïdienne. La thyroxine et la triiodothyronine sont engendrées par l'iodation catalysée par TPO et par l'accouplement de tyrosines homogéniques spécifiques. La mesure des auto-anticorps à la thyroglobuline et à la TPO est importante pour le diagnostic de maladies thyroïdiennes autoimmunes. Ces anticorps peuvent être mesurés par différentes méthodes telles que l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination passive et la méthode ELISA.

### PRINCIPES DE LA MÉTHODE

Le test ELISA est réalisé sous la forme d'un dosage immunologique sur phase solide. Des microplaques à puits sont enduites avec des antigènes natifs thyroglobuline, suivi d'un blocage des sites inaltérés pour réduire l'agglutination non-spécifique. Les contrôles, les calibreurs et les échantillons de sérum des patients sont incubés dans les puits enduits d'antigène qui permettent aux anticorps spécifiques qui sont présents dans le sérum de s'agglutiner avec l'antigène thyroglobuline. L'anticorps non agglutiné et les autres protéines du sérum sont éliminés en nettoyant les puits des microplaques. Les anticorps agglutinés sont détectés en ajoutant un conjugué d'anticorps à marquage enzymatique pour l'IgG humain aux micropuits. Le conjugué non-agglutiné est éliminé par lavage.

La phosphatase alcaline et son substrat (pNPP) est ensuite ajoutée aux puits et la présence d'anticorps est détectée par un changement de couleur engendré par la conversion de substrat du pNPP vers un produit de réaction coloré. La réaction est arrêtée et l'intensité du changement de la couleur, qui est proportionnelle à la concentration d'anticorps est lue par un spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats sont exprimés en Unités Internationales par millilitre (IU/ml).

### RÉACTIFS

#### Stockage et préparation

Conserver tous les réactifs à 2° - 8°C. **Ne pas congeler.**

Ne pas utiliser si le réactif n'est pas clair ou si un précipité est présent. Tous les réactifs doivent être amenés à température ambiante (20°-25°C) avant l'usage.

Quand elle est entreposée à 2°-8°C, la solution de lavage reconstituée est stable jusqu'à la date d'expiration de la trousse. Reconstituer la solution de lavage dans 1 litre avec de l'eau distillée ou de l'eau désionisée.

Les bandes des microplaques à puits enduites sont destinées à être utilisées une fois seulement.



## Précautions

Destiné à un usage diagnostique *in vitro* Tous les composants humains dérivés utilisés ont été testés pour HBsAg, HCV, HIV 1 et 2 et HTLV et se sont révélés négatifs sur la base des tests qui sont exigés par l'administration FDA. Cependant, les dérivés du sang humain et les spécimens des patients doivent toujours être considérés comme étant potentiellement infectieux. Il faut appliquer de bonnes pratiques de laboratoire au cours du stockage, de la distribution et de la manipulation de ces matériaux<sup>6</sup>.

**AVERTISSEMENT** – L'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) peut réagir avec les tuyauteries en plomb et en cuivre pour former des azides de métal qui sont très explosifs. Au moment de l'élimination des liquides, rincer avec de grands volumes d'eau afin de prévenir l'intensification de l'azide. L'azide de sodium peut être toxique en cas d'ingestion. En cas d'ingestion, il faut immédiatement signaler l'accident au directeur du laboratoire ou au centre antipoison.

**Les instructions doivent être suivies exactement dans l'ordre dans lequel elles sont fournies dans la présente brochure de l'équipement pour garantir l'obtention de résultats valables.** Il ne faut pas échanger les composants de l'équipement avec d'autres provenant d'autres sources si ce n'est ceux qui portent le même numéro de catalogue d'A. Menarini Diagnostics S.r.l.. Il faut respecter de bonnes pratiques de laboratoire pour limiter la contamination microbienne et la contamination croisée des réactifs au moment de la manipulation. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

## Matériel fourni

Menarini™ Anticorps Thyroglobuline (Tg) ELISA **REF** 38099

Les kits contiennent les réactifs suffisants pour effectuer 96 tests chacun.

12 x 8	<b>MICROPLATE</b>   <b>Tg</b>	<b>Microplaques</b> avec micropuits individuels séparables enduits avec de l'antigène Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>A</b>   <b>Tg</b> *	<b>Calibreur A</b> ( <i>couvercle vert</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>B</b>   <b>Tg</b> *	<b>Calibreur B</b> ( <i>couvercle violet</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>C</b>   <b>Tg</b> *	<b>Calibreur C</b> ( <i>couvercle bleu</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CALIBRATOR</b>   <b>D</b>   <b>Tg</b> *	<b>Calibreur D</b> ( <i>couvercle jaune</i> ), prêt à l'emploi. Contient sérum humain positif anticorps anti-Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>+</b>   <b>Tg</b> *	<b>Régulateur positif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle rouge</i> ). Contient du sérum humain positif pour les anticorps anti-Tg.
1 x 1,5 ml	<b>CONTROL</b>   <b>-</b> *	<b>Régulateur négatif</b> prêt à l'emploi ( <i>couvercle blanc</i> ). Contient du sérum humain.
1 x 12 ml	<b>IgG-CONJ</b>   <b>ALKPHOS</b> *	<b>Conjugué anti-IgG</b> humain prêt à l'emploi. Codé en couleur rose.
1 x 60 ml	<b>DIL</b> *	<b>Diluant de sérum</b> prêt à l'emploi. Codé en couleur bleue.
1 x 12 ml	<b>SUBSTRATE</b> *	<b>Substrat d'enzyme</b> prêt à l'emploi. Contient du pNPP. <b>Conserver à l'abri de la lumière.</b>
1 x 12 ml	<b>STOP</b>	<b>Solution d'arrêt</b> prête à l'emploi.
2 x	<b>BUF</b>   <b>WASH</b>	Poudre <b>Wash Buffer</b> (solution de lavage). Reconstituer en un litre chacun.

\* Contient <0.1%  $\text{NaN}_3$


**Symboles utilisés sur les étiquettes:**

-  Numéro de lot
-  Numéro de référence catalogue
-  A utiliser avant
-  Température de conservation
-  Lire les instructions d'utilisation
-  Pour usage diagnostique In vitro
-  Fabricant
-  Nombre de tests

**Matériel nécessaire mais non fourni**

- Eau distillée ou désionisée
- Pissette en plastique pour contenir la solution de lavage diluée
- Pipettes en mesure de délivrer de 5 µl à 1000 µl
- Bouchons de pipette jetables
- Éprouvettes de test propres 12 x 75 mm et porte-éprouvettes de test
- Compte-minutes
- Serviettes de papier absorbant
- Lecteur de microplaque en mesure de lire des valeurs d'absorption à 405 nm. Si un lecteur de microplaque à double longueur d'onde est disponible, le filtre de référence doit être placé à 600-650 nm.
- Nettoyeur automatique de microplaque en mesure de dispenser 200 µl

**RÉCOLTE DES SPÉCIMENS ET MANIPULATION**

Seuls des spécimens de sérum doivent être utilisés dans cette procédure. Des spécimens grossièrement hémolysés, lipémiques ou frappés de contamination microbienne peuvent avoir une influence sur les résultats de l'essai et ne devraient pas être utilisés. Entreposer les spécimens à 2 - 8°C pendant un laps de temps qui ne doit pas dépasser une semaine. Dans le cas d'un stockage plus long, les spécimens de sérum devraient être congelés. Éviter des congélations et des décongélations répétées des échantillons.

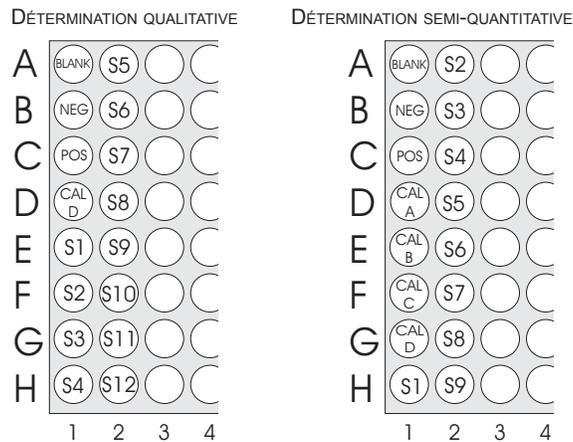
**PROCÉDURE**
**Notes de procédure**

- Avant de commencer l'essai, il faut lire avec soin la brochure qui accompagne le produit.
- Conserver les spécimens de sérum et les réactifs de test à température ambiante avant d'entreprendre la procédure de test. Remettre immédiatement tous les spécimens inutilisés et les réactifs au réfrigérateur après usage.
- Toutes les dilutions des échantillons des patients doivent être préparées avant de commencer l'essai.
- Le recours à une bonne technique de lavage s'avère fondamentale. Si le lavage est réalisé manuellement, il est effectué de manière adéquate en dirigeant un flux puissant de solution de lavage avec un flacon-laveur à pointe large à travers toute la microplaque. **On conseille de recourir à un dispositif automatique de lavage de la microplaque.**
- Utiliser une pipette multicanaux en mesure de délivrer simultanément sur 8 puits. Cela accélère le processus et permet d'obtenir une période d'incubation plus constante.
- À chaque étape, un contrôle soigneux du chronométrage s'avère important. Le début des périodes d'incubation commence quand l'addition du réactif a eu lieu.
- L'addition de tous les échantillons et des réactifs doit avoir lieu au même taux et selon la même séquence.

- Enlever les bandes des microplaques à puits nécessaires du sachet et refermer avec soin le sachet afin de prévenir la condensation dans les puits inutilisés. Remettre immédiatement le sachet dans le réfrigérateur.

### Méthode de test

- Étape 1** Laisser tous les réactifs et les spécimens atteindre la température ambiante.
- Étape 2** Étiqueter la feuille de protocole pour indiquer l'emplacement de l'échantillon dans les puits. Une bonne pratique de laboratoire consiste à traiter les échantillons en double.
- Étape 3** Pour une **détermination qualitative**, utiliser seulement le Calibreur Bas D prêt à l'emploi (*fiolle avec couvercle jaune*).  
**ou** Pour un **dosage semi-quantitatif**, utiliser les Calibreurs A à D prêts à l'emploi comme montré dans le schéma d'échantillon figurant ci-dessous.



- Étape 4** Préparer une dilution **1:201** des échantillons patient en mélangeant **5 µl** du sérum patient avec **1.0 ml** de diluant de sérum.
- Étape 5** Enlever les microplaques à puits nécessaires du sachet et remettre les bandes inutilisées dans le sachet scellé au réfrigérateur. Placer solidement les microplaques à puits dans le support fourni comme accessoire.
- Étape 6** Pipeter **100 µl** des calibreurs prêts à l'emploi, des régulateurs positifs et négatifs et des échantillons patients dilués dans les puits appropriés conformément au feuillet de protocole.  
**Note** : Inclure un puits qui contient **100 µl** du diluant de sérum à titre de réactif à blanc. Mettre le lecteur ELISA à zéro par rapport au réactif à blanc.
- Étape 7** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.
- Étape 8** Laver **4x** avec de la solution de lavage. En cas de lavage manuel, remplir chaque puits avec de la solution de lavage reconstituée. Éliminer le fluide en renversant et en tapotant le contenu de chaque puits ou en aspirant le liquide de chaque puits. Pour absorber à la fin du dernier lavage, renverser les bandes et tapoter vigoureusement les puits sur les serviettes de papier absorbant. Dans le cas de dispositifs de lavage automatiques, programmer le dispositif de lavage en suivant les instructions du fabricant.
- Étape 9** Pipeter **100 µl** de conjugué dans les microplaques à puits.
- Étape 10** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.
- Étape 11** Laver tous les puits comme décrit dans l'étape 8.
- Étape 12** Pipeter **100 µl** de substrat d'enzyme dans chaque puits dans le même ordre et chronométrer comme pour le conjugué.
- Étape 13** Incuber pendant **30 minutes** ( $\pm 5$  min) à température ambiante.



**Étape 14** Pipeter **100 µl** de solution d'arrêt dans chaque puits en ayant recours au même ordre et au même chronométrage que pour l'addition du substrat d'enzyme. Lire les taux d'absorption dans un laps de temps de 1 heure après l'addition de la solution d'arrêt.

**Étape 15** Lire l'absorption de chaque puits à **405 nm** en utilisant un lecteur de microplaques à simple ou à double longueur d'onde 405/630nm par rapport au réactif à blanc programmé sur une absorption zéro.

### Contrôle de qualité

Des calibres, des régulateurs positif et négatif et un réactif à blanc doivent être utilisés à chaque essai pour vérifier l'intégrité et l'exactitude du test. La lecture de l'absorption du réactif à blanc doit être inférieure à 0,3. Le calibre A doit présenter une mesure de l'absorption qui ne doit pas être inférieure à 1,0, sans quoi le test doit être recommencé. Le contrôle négatif doit être inférieur à 80 IU/ml. Si l'essai est effectué en double, la moyenne des deux lectures doit être prise pour déterminer IU/ml. Quand on procède aux dosages qualitatifs, la densité optique du Calibreur D doit être supérieure à celle du régulateur négatif et inférieure à l'absorption du régulateur positif. Pour les dosages semi-quantitatifs, le régulateur positif doit fournir des valeurs s'inscrivant dans la plage figurant sur la fiole.

### RÉSULTATS

#### Calculs

Les concentrations des échantillons de patient peuvent être déterminées par l'une ou l'autre de ces deux méthodes :

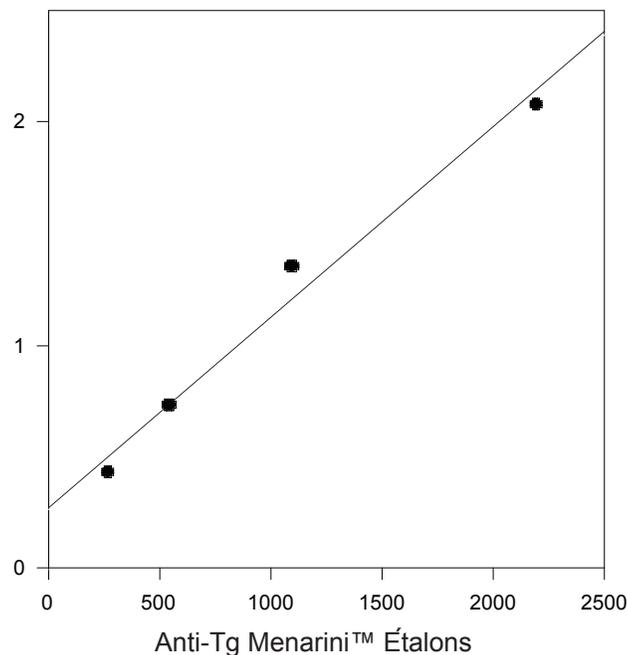
#### 1. DOSAGE QUALITATIF

$$\frac{\text{Abs. de l'échantillon d'essai}}{\text{Abs. du calibreur D}} \times \text{IU/ml du calibreur D} = \text{IU/ml échantillon de test}$$

#### 2. DOSAGE SEMI-QUANTITATIF

Relever l'absorption du Calibreur A à D par rapport à leur concentration respective sur un papier quadrillé linéaire-linéaire. Relever la concentration en IU/ml sur l'axe des abscisses contre l'absorbance sur l'axe des ordonnées et tracer la courbe optimale. Déterminer les concentrations des échantillons de patient de la courbe par rapport à sa valeur d'absorption correspondante.

Anti-Tg Menarini™ Courbe standard





### Calibreur

Les calibreurs prêts à l'emploi sont inclus pour fournir la semi-quantification et doivent être utilisés à chaque opération. Les échantillons patient qui contiennent les niveaux d'anticorps les plus élevés peuvent produire des taux d'absorption plus élevés que ceux du calibreur A. Pour déterminer des valeurs semi-quantitatives précises, ces échantillons de sérum doivent en outre être dilués de telle manière qu'ils s'inscrivent dans la plage de la courbe du calibreur quand on refait l'essai. Pour la détermination IU/ml, multiplier les unités obtenues par le facteur de dilution.

### Interprétation

Ce qui figure ci-dessous sert uniquement comme guide pour l'interprétation des résultats. Ces valeurs ont été déterminées en testant 80 donateurs de sang normaux. Les valeurs fournies ci-dessous représentent la moyenne des sujets normaux plus 2SD. Chaque laboratoire doit déterminer ses propres valeurs normales.

Valeur antiTg	Interprétation
≤80 IU/ml	Négatif
>80 IU/ml	Positif

### LIMITES DE LA PROCÉDURE

Des auto-anticorps thyroïdiens peuvent également être présents dans les maladies non-thyroïdiennes. Les résultats obtenus à la suite de cet essai ne représentent pas en eux-mêmes un diagnostic des maladies thyroïdiennes et doivent être considérés de manière conjointe avec le captage de l'iode et d'autres tests thyroïdiens standards ainsi qu'avec le tableau clinique du patient.

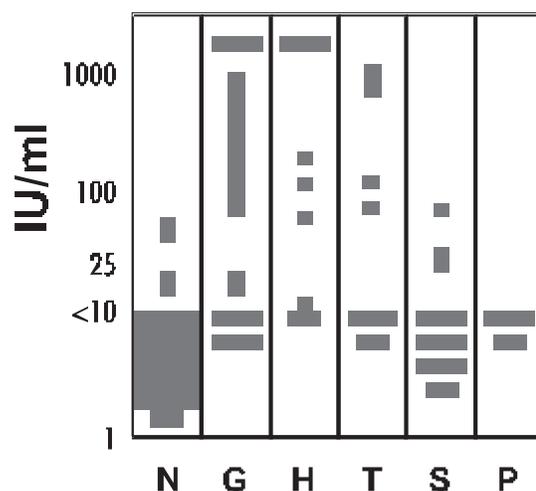
### VALEURS ATTENDUES

Les valeurs attendues dans une population normale sont négatives. Cependant, on a remarqué que 5-10% d'individus apparemment sains, asymptomatiques peuvent apparaître positifs aux anticorps thyroïdiens. L'incidence de ces auto-anticorps augmente avec l'âge.

Le tableau et la figure ci-dessous montrent l'incidence des auto-anticorps thyroïdiens dans les situations normales et dans les situations de maladie en utilisant des plaques à antigène Menarini™. Les anticorps anti-thyroglobuline se manifestent essentiellement dans les maladies de *Graves* et d'*Hashimoto*. Ces anticorps peuvent également se manifester dans le goitre nodulaire toxique et en association avec certains autres troubles autoimmuns, tel que le lupus érythémateux systémique (SLE).

### Signification des anticorps thyroïdiens

Spécificité Ab	Association maladie	Indications
<b>Thyroglobuline (Tg)</b>	1) maladies thyroïdiennes autoimmunes 2) niveaux thyroglobuline incorrects	complément aux niveaux thyroglobuline
<b>Microsomal (TPO)</b>	Maladie thyroïdienne autoimmune	1) Goitre à étiologie inconnue 2) Hyperthyroïdisme

**Incidence des anticorps à la Tg**


N = Normaux (99), G = Maladie de Grave (25), H = Maladie de Hashimoto (15), T = Goitre toxique multi nodulaire (11), S = Lupus érythémateux disséminé (20), P = Cirrhose biliaire primaire (9)

**DONNÉES DE RENDEMENT**

Les résultats obtenus avec le test ELISA anti-Tg Menarini™ ont été comparés avec d'autres essais présents dans le commerce.

		Menarini™		Total
		Positif	Négative	
Autres ELISA	Positif	49	4	53
	Négatif	8	61	69
	Total	57	65	122

Concordance relative : 90,2%

Sensibilité relative : 92,5%

Spécificité relative : 88,4%

**Précision :**

Trois sérums positifs aux anticorps anti-Tg ont été testés avec ELISA anti-Tg Menarini™ afin de déterminer la variabilité inter et intra-dosage. Les résultats figurent ci-dessous.

	valeur	inter-dosage	intra-dosage
	moyenne IU/ml	%CV	%CV
Échantillon 1	357,5	11,6	7,9
Échantillon 2	522,0	8,0	6,9
Échantillon 3	1015,5	5,2	6,5

**Récupération :**

Des échantillons avec des concentrations connues d'anticorps anti-Tg ont été mélangés avec des dilutions appropriées d'un autre échantillon avec des montants connus d'anticorps. Les niveaux des anticorps anti-Tg des échantillons mélangés ont été déterminés et on a calculé le pourcentage de récupération à partir des valeurs obtenues. Les résultats sont les suivants :



	<b>Tg-Ab conc. ajouté (IU/ml)</b>	<b>Tg-Ab conc. obtenu (IU/ml)</b>	<b>% Récupération</b>
<b>Échantillon 1</b>	1100,0	1015,5	92,3
<b>Échantillon 2</b>	575,0	522,0	90,8
<b>Échantillon 3</b>	306,0	357,5	116,8



**REFERENCES • BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ • LITERATUR • BIBLIOGRAPHIE • BIBLIOGRAFIA**

1. Mooij P, Drexhage HA. Autoimmune thyroid disease. *Clini Lab Med.* 13:683-697, 1993.
2. Champion BR, Cooke A, Reyner DC. Thyroid autoimmunity. *Curr Opinion Immunol.* 4:770-778, 1992.
3. Lindstedt G, Berg G, Jansson S, et al Clinical use of laboratory thyroid tests and investigations. *J Int Fed Clin Chem* 6:136-141, 1994.
4. Pashke R, Vogg M, Swillens S, Usadel KH. Correlation of microsomal antibodies with the intensity of the intrathyroidal autoimmune process in Grave's disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:939-943, 1993.
5. Sundbeck G, Eden S, Jagenburg R, et al. Prevalence of serum anti-thyroid peroxidase antibodies in 85 year-old women and men. *Clin Chem;* 41:707-712, 1995.
6. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Centers for Disease Control, National Institutes of Health [HHS Pub. No. (CDC) 93-8395], 1993.



 **A. Menarini Diagnostics S.r.l.**  
via Sette Santi 3  
50131 Firenze  
Italia

**EL**

Διανέμεται στην  
**ΕΛΛΑΔΑ** από την  
A. Menarini Diagnostics S.A.  
575, Vouliagmenis Ave.  
16451 Argypopolis  
Attiki

**AT**

**ÖSTERREICH**  
Vertrieb durch  
A. Menarini Ges.m.b.H  
Pottendorfer Straße, 25/27  
A - 1120 Wien

**BE**

**BELGIQUE**  
Distribué par  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux S.A./N.V.  
Belgicastaat, 4  
1930 Zaventem

**PT**

**PORTUGAL**  
Distribuido por  
A. Menarini Diagnósticos, Lda  
Quinta da Fonte  
Edifício D.Manuel I, 2ºB  
2770-203 Paço de Arcos

**NL**

**NEDERLAND**  
Distributed by  
A. Menarini Diagnostics  
Benelux N.V.  
De Haak, 8  
5555 XK Valkenswaard

Date of issue: March 2007  
Data de publicação: Março de 2007  
Ausgabedatum: März 2007  
Date d'émission : Mars 2007  
Ημερομηνία έκδοσης: Μάρτιος 2007

Document No. PI4131 CE M

