



# DiaMetra



## Anti TPO

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi contro la tiroperossidasi nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  test

REF DKO116

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'Anti-TPO in siero o plasma umano.

Il kit Anti TPO è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi Anti-TPO (detti anche anticorpi microsomiali della tiroide) sono diretti contro la perossidasi della tiroide (TPO) situata nel reticolo endoplasmico liscio delle cellule della tiroide.

La perossidasi della tiroide o Tiroperossidasi (TPO) è un enzima principalmente espresso nella tiroide che permette l'aggiunta dello iodio sui residui tirosinici della tiroglobulina per la sintesi della tiroxina (T4) o della triiodotironina (T3) (ormoni tiroidei).

Nelle malattie autoimmunitarie, il sistema immunitario libera gli anticorpi che attaccano erroneamente l'organismo quale, ad esempio, la perossidasi della tiroide.

Gli Anticorpi che attaccano la ghiandola tiroidea causano l'infiammazione e la disfunzione della tiroide.

La presenza degli anticorpi del anti-TPO nel siero è associata con le malattie autoimmuni della tiroide (malattia di Graves e di Hashimoto). Gli anticorpi Anti-TPO sono di classe IgG.

Livelli bassi degli anticorpi anti-TPO nel siero possono essere trovati nelle patologie autoimmuni (per esempio lupus o sindrome di Sjogren) e, raramente, negli individui sani apparentemente (particolarmente in donne anziane). Il dosaggio degli anticorpi di Anti-TPO è un metodo di diagnosi sensibile delle malattie autoimmunitarie della tiroide piuttosto che gli anticorpi anti-tiroglobulina (anti-TG). Tuttavia, in alcuni casi i sieri positivi anti-TG possono essere negativi per anti-TPO. Di conseguenza, la determinazione di entrambi i tipi di anticorpi antitiroide (anti-TPO + anti-TG) fornisce una diagnosi di laboratorio più sensibile per l'autoimmunità della tiroide.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio immunoenzimatico del sandwich. Il campione da testare viene incubato nella micropiastra coattata con l'antigene.

Gli anticorpi contenuti del campione si legano agli antigeni presenti sulla superficie della micropiastra. Il materiale non legato è rimosso con una procedura di lavaggio.

Un secondo anticorpo anti-IgG umano coniugato con perossidasi viene messo a incubare nei pozzetti.

Dopo il successivo lavaggio, viene determinata e quantificata la rimanente attività enzimatica legata alla superficie dei pozzetti mediante l'aggiunta del substrato cromogeno e della stop solution e mediante lettura a 450 nm. La densità ottica nei pozzetti è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Anti-TPO Standards (6 flaconi, 1,2 mL ciascuno)  
Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

STD0 **REF DCE002/11606-0**

STD1 **REF DCE002/11607-0**

STD2 **REF DCE002/11608-0**

STD3 **REF DCE002/11609-0**

STD4 **REF DCE002/11610-0**

STD5 **REF DCE002/11611-0**

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)  
Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

Controllo Negativo **REF DCE045/11601-0**

Controllo Positivo **REF DCE045/11602-0**

3. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)  
Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%

**REF DCE053-0**

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)  
Anti h-IgG coniugato con perossidasi, BSA 0,1%,  
Proclin <0,0015%

**REF DCE002/11602-0**

5. Coated Microplate  
(1 micropiastra breakable con Tiroperossidasi  
antigenica adsorbita)

**REF DCE002/11603-0**

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) **REF DCE004-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

8. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M **REF DCE005-0**

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm)

#### 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione degli standard e dei controlli sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di

HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, gli Standards e i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.

- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide ( $\text{NaN}_3$ ) o di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La sodio-azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

## 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni;** si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.**  
A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.

- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 6. CONDIZIONI DI CONSERVAZIONE

- Conservare tutti i reagenti del kit a 2-8°C. Non congelare. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate nella busta ben chiusa a 2-8°C.

## 7. PROCEDIMENTO

### 7.1. Preparazione degli Standard ( $S_0, \dots, S_5$ )

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. Gli standard hanno approssimativamente le seguenti concentrazioni:

	$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$	$S_5$
AU/mL	0	5	10	20	80	320

### 7.2. Preparazione del campione

La matrice di elezione per la determinazione degli anticorpi anti-TPO è siero o plasma umano. Tutti i campioni di siero devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent. Quindi 10  $\mu\text{L}$  di campione possono essere diluiti con 990  $\mu\text{L}$  di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare.

Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Non usare campioni microbiologicamente contaminati, così come campioni altamente lipemici o emolizzati. I Controlli sono pronti all'uso.

### 7.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50x) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La

soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

#### 7.4. Procedimento

Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per al meno 30 minuti.  
Poiché è necessario operare in doppio, allestire due pozzetti per ogni punto della curva Standard (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>), due per ogni Campione e Controllo ed una per il Bianco.

Reagente	Standard	Campione o Controlli	Bianco
Standard S <sub>0</sub> -S <sub>5</sub>	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 µL di wash solution diluita			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 µL di wash solution diluita			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperature ambiente (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco.			

## 8. RISULTATI

### 8.1. Curva Standard

Per l'Anti-TPO il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-TPO. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

STD	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
0	0,012	0,013	0,013	0	0,03	0,02	141,42
1	0,125	0,121	0,123	5,65	5,45	5,55	2,49
2	0,212	0,210	0,211	9,94	9,84	9,89	0,71
3	0,395	0,422	0,409	19,37	20,83	20,10	5,12

4	1,303	1,221	1,262	84,12	76,43	80,28	6,77
5	2,521	2,474	2,498	330,2	310,9	320,52	4,26

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-TPO:

Anti-TPO [AU/mL]

Normale: < 20

Elevato : ≥ 20

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di Anti-TPO serica.

### 9.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 78 sieri (di cui 50 positivi e 28 negativi) hanno mostrato una specificità del 92,9%.

### 9.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 78 sieri (di cui 50 positivi e 28 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 94,0%.

### 9.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-TPO che può essere distinta dallo standard zero è 0,09 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

## 10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

## BIBLIOGRAFIA

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beaver K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

Ed. 02/2011

DCM116-4

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18 – 20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595  
Fax 0039-02-2133354.

**Manufactory:** Via E. Giustozzi 35 – Z.I Paciana – 06034 FOLIGNO (PG) Italy  
Tel. 0039-0742-24851  
Fax 0039 -0742-316197  
E-mail: info@diametra.com



DiaMetra



## Anti TPO

for routine analysis

Quantitative determination of antibodies against Thyroperoxidase in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO116

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Anti-TPO concentration in human serum or plasma.

Anti TPO kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Anti-TPO antibodies (formerly thyroid microsomal antibodies) are directed against a target protein - thyroid peroxidase (TPO) - located in the smooth endoplasmic reticulum of thyroid cells.

Thyroid peroxidase or Thyroperoxidase (TPO) is an enzyme mainly expressed in the thyroid that liberates iodine for addition onto tyrosine residues on thyroglobulin for the production of thyroxine (T4) or triiodothyronine (T3) (thyroid hormones).

It is a frequent epitope of autoantibodies in autoimmune thyroid disease. In autoimmune disorders, your immune system makes antibodies that mistakenly attack normal tissue such as thyroid peroxidase. Antibodies that attack the thyroid gland cause inflammation and impaired function of the thyroid.

The presence of anti-TPO antibodies in serum is associated with thyroid autoimmune diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). Anti-TPO antibodies mostly belong to the IgG class.

Low to moderate levels of serum anti-TPO antibodies can be found in some other autoimmune pathology (eg systemic lupus erythematosus or Sjogren syndrome) and, rarely, in apparently healthy subjects (especially elderly women). Anti-TPO antibodies are more sensitive in diagnostics of thyroid autoimmune diseases than anti-thyroglobulin (anti-TG) antibodies.

However, in some cases anti-TG positive sera may be negative for anti-TPO. Therefore, combined determination of both types of anti-thyroid antibodies (anti-TPO + anti-TG) provides a more sensitive laboratory diagnostic tool for thyroid autoimmunity.

### 2. PRINCIPLE

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by the antigen. Antibodies from the specimen bind coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards human Ig and labeled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogensubstrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of specific antibodies in the specimen.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagent and material supplied in the kit

- Anti TPO Standards (6 vials, 1.2 mL each)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1%, human serum  
STD0 **REF DCE002/11606-0**  
STD1 **REF DCE002/11607-0**  
STD2 **REF DCE002/11608-0**  
STD3 **REF DCE002/11609-0**  
STD4 **REF DCE002/11610-0**  
STD5 **REF DCE002/11611-0**
- Controls (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1%, human serum  
Negative Control **REF DCE045/11601-0**  
Positive Control **REF DCE045/11602-0**
- Sample Diluent (1 vial, 100 mL)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1%  
**REF DCE053-0**
- Conjugate (1 vial, 15 mL)  
Anti h-IgG conjugated with peroxidase, BSA 0.1%, Proclin <0.0015%  
**REF DCE002/11602-0**
- Coated Microplate  
(1 breakable microplate coated with antigenic Thyroperoxidase)  
**REF DCE002/11603-0**
- TMB Substrate (1 vial, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L)  
**REF DCE004-0**
- 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L  
**REF DCE006-0**
- Stop Solution (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15M  
**REF DCE005-0**

#### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

#### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm)

### 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.

- All human source material used in the preparation of standards and controls for this product has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Standard and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) or Proclin 300<sup>®</sup> as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants.

## 5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.** For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.
- If you use automated equipment is your responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.

- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. STORAGE CONDITION

- Store all the kit reagents at 2-8°C. Do not freeze. Reagents are stable until the expiration date when stored and handled as directed.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.

## 7. PROCEDURE

### 7.1. Preparation of the Standard (S<sub>0</sub>,...,S<sub>5</sub>)

The assay system is calibrated in relative arbitrary units. The standard have approximately the following concentration:

	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>
AU/mL	0	5	10	20	80	320

### 7.2. Preparation of the Sample

For determination of Anti-TPO human serum or plasma is the preferred sample matrix.

Serum samples have to be prediluted with sample diluent 1:100. Therefore 10 µL of sample may be diluted with 1,000 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2 - 8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Do not use microbiologically contaminated samples, as highly lipemic or hemolized samples.

The Controls are ready to use.

### 7.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

#### 7.4. Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C). As it is necessary to perform the determination in duplicate, prepare two wells for each of the six points of the standard curve (S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub>), two for each sample and control, one for Blank.

Reagent	Standard	Sample or Controls	Blank
Standard S <sub>0</sub> -S <sub>5</sub>	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank.			

#### 8. RESULTS

##### 8.1. Standard curve

For Anti-TPO a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However we recommend using a Lin-Log curve.

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

##### Typical results (example only)

The figures below show typical results for Anti-TPO. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

STD	OD1	OD2	mean	C1	C2	Mean	CV%
0	0,012	0,013	0,013	0	0,03	0,02	141,42
1	0,125	0,121	0,123	5,65	5,45	5,55	2,49
2	0,212	0,210	0,211	9,94	9,84	9,89	0,71
3	0,395	0,422	0,409	19,37	20,83	20,10	5,12
4	1,303	1,221	1,262	84,12	76,43	80,28	6,77
5	2,521	2,474	2,498	330,2	310,9	320,52	4,26

#### 9. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-TPO tests:

Anti-TPO	[AU/mL]
normal:	< 20
elevated:	≥ 20

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti-TPO.

##### 8.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 78 sera (50 of them positive sera and 28 negative sera) shows a 92.9% specificity.

##### 8.2. Sensibility

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 78 sera (50 of them positive sera and 28 negative sera) shows a 94.0% sensibility.

##### 8.3. Detection limit

The lowest concentration of anti-TPO that can be distinguished from zero standard is 0.09 AU/mL with a confidence limit of 95%.

#### 10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

#### BIBLIOGRAPHY

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

Ed. 02/2011

DCM116-4

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18 – 20090

SEGRATE (MI) Italy

Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595

Fax 0039-02-2133354.

**Manufactory:** Via Giustozzi, 35/35a – Z.I Paciana – 06034

FOLIGNO (PG) Italy

Tel. 0039-0742-24851

Fax 0039-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

**IT**  
Spiegazione dei simboli












**GB**  
Explanation of symbols

**FR**  
Explication des symboles

**ES**  
Significado de los simbolos

**DE**  
Verwendete Symbole

**PT**  
Explicação dos simbolos

	<p>DE In vitro Diagnostikum  ES Producto sanitario para diagnóstico In vitro  FR Dispositif medical de diagnostic in vitro  GB In vitro Diagnostic Medical Device  IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro  PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro</p>		<p>DE Hergestellt von  ES Elaborado por  FR Fabriqué par  GB Manufacturer  IT Produttore  PT Produzido por</p>
<b>REF</b>	<p>DE Bestellnummer  ES Número de catálogo  FR Références du catalogue  GB Catalogue number  IT Numero di Catalogo  PT Número do catálogo</p>	 yyyy-mm	<p>DE Herstellungs datum  ES Fecha de fabricacion  FR Date de fabrication  GB Date of manufacture  IT Data di produzione  PT Data de produção</p>
 yyyy-mm-dd	<p>DE Verwendbar bis  ES Establa hasta (usar antes de último día del mes)  FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué)  GB Use by (last day of the month)  IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese)  PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)</p>		<p>DE Biogefährdung  ES Riesco biológico  FR Risque biologique  GB Biological risk  IT Rischio biologico  PT Risco biológico</p>
 	<p>DE Gebrauchsanweisung beachten  ES Consultar las instrucciones  FR Consulter le mode d'emploi  GB Consult instructions for use  IT Consultare le istruzioni per l'uso  PT Consultar instruções para uso</p>		<p>DE Chargenbezeichnung  ESCodigo de lote  FR Numero de lot  GB Batch code  IT Codice del lotto  PT Codigo do lote</p>
 $\Sigma = xx$	<p>DE Ausreichend für "n" Tests  ES Contenido suficiente para "n" tests  FR Contenu suffisant pour "n" tests  GB Contains sufficient for "n" tests  IT Contenuto sufficiente per "n" saggi  PT Contém o suficiente para "n" testes</p>		<p>DE Inhalt  ES Contenido del estuche  FR Contenu du coffret  GB Contents of kit  IT Contenuto del kit  PT Conteúdo do kit</p>
 Max Min	<p>DE Temperaturbereich  ES Límitación de temperatura  FR Limites de température de conservation  GB Temperature limitation  IT Limiti di temperatura  PT Temperaturas limites de conservação</p>		

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING

### ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

#### Nessuna reazione colorimetrica del saggio

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

#### Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

#### Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

#### Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

#### CV% intra-assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

#### CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

### ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

#### No colorimetric reaction

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

#### Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

#### Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

#### Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation