

Bioclin

Biolisa Anti TG

K104

INSTRUÇÕES DE USO

FINALIDADE

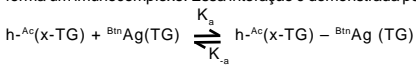
Teste para determinação quantitativa de Auto-Anticorpos Anti-Tireoglobulina (TG) em soro ou plasma humano, Enzimaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia : Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrico

Nesta metodologia, primeiro são pipetados nas respectivas microcavidades da placa os padrões de referência, amostras diluídas de pacientes e controles. Em seguida, adiciona-se o Conjugado Biotinilado e a reação é homogeneizada. Da reação entre os auto-anticorpos contra TG e o Conjugado Biotinilado de TG forma-se um imunocomplexo que é depositado na superfície das microcavidades revestidas com streptavidina, através da alta reatividade da biotina com a streptavidina.

A reação resultante entre a mistura do Antígeno de Tireoglobulina (TG) e um soro contendo anticorpos forma um imunocomplexo. Essa interação é demonstrada pela seguinte equação:



Onde:

${}^{Bn}Ag(TG)$ = Antígeno Biotinilado (constante)

$h^{-Ac}(x-TG)$ = Auto-anticorpo humano (variável)

${}^{Ac}(x-TG)-{}^{Bn}Ag(TG)$ = Imunocomplexo (variável)

K_a = razão constante de associação

K_{-a} = razão constante de dissociação

Após completado o período de incubação, é aspirado ou decantado a parte da reação que não adere às microcavidades. Uma enzima anti-humana IgG é adicionada para permitir a quantificação da reação através da interação com os Anticorpos humanos IgG do imunocomplexo. Após a etapa de lavagem, a atividade enzimática é determinada pela reação de cor, produzida com substrato.

O uso de diversos padrões de referência de anticorpos ativos conhecidos permite a construção de uma curva de calibração. A atividade enzimática das amostras desconhecidas (pacientes) é comparada com a curva de calibração, determinando-se o nível de anticorpos dessas amostras através da correlação das mesmas com a curva.

REAGENTES

1) Padrões referência (A-F)

Seis (6) frascos (A-F) de Padrões referência contendo Anti-Tireoglobulina em diferentes concentrações em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 8°C.

A = 0 UI/mL

B = 50 UI/mL

C = 125 UI/mL

D = 500 UI/mL

E = 1000 UI/mL

F = 2000 UI/mL

2) Conjugado Biotinilado (▽)

Antígeno Tireoglobulina (TG) biotinilado em solução matriz. Contém azida sódica. Estocar entre 2 e 8°C.

3) Conjugado Enzimático (E)

Anticorpo anti-humano classe IgG Peroxidase (HRP) em solução matriz. Contém azida sódica. Estocar entre 2 e 8°C.

4) Placa Sensibilizada (▽)

Estocar entre 2 e 8°C.

5) Diluente de Amostra Concentrado

Diluente de soro contendo solução salina e corante. Estocar entre 2 e 8°C

6 - Lavagem concentrada (◆)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 30°C.

7 - Substrato A (S^A)

Tetrametilbenzidina (TMB). Estocar entre 2 e 8°C.

8 - Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estocar entre 2 e 8°C.

9) Solução de parada (P)

Ácido Clorídrico (HCl) 1N. Estocar entre 2 e 30° C.

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	96 microcavidades
1 - Padrões Referência	6 Frascos A-F x 1,0 mL
2 - Conjugado Biotinilado	1 Frasco x 13 mL
3 - Conjugado Enzimático	1 Frasco x 13 mL
4 - Placa sensibilizada	1 Unidade x 96 poços
5 - Diluente de Amostra concentrado	1 Frasco x 20 mL
6 - Lavagem concentrada	1 Frasco x 20 mL
7 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL
8 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL
9 - Solução de Parada	1 Frasco x 8 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no Kit:

-Reagentes descritos no item anterior

-Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

1) Pipeta(s) com capacidade de dispensar volumes de 50 µL, com precisão maior que 1,5%.

2) Repipetador(es) para dispensagens repetitivas de volumes de 100 µL e 300 µL, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.

3) Lavadora de microplaca (opcional) ou pipetas para lavagem das microcavidades.

4) Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 / 630 nm de comprimento de onda.

5) Pipetas com volumes reguláveis (200 µL a 1000 µL) para diluição do Substrato.

6) Tubos de ensaio para a diluição do Substrato A e B.

7) Papel absorvente para secar as microcavidades.

8) Embalagem plástica ou cobertura de microplaca para os passos de incubação.

9) Cronômetro ou relógio.

10) Frasco para estocar a solução de lavagem.

11) Água destilada ou deionizada.

12) Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. **Não congelar.** Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;

2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;

3 - Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C.

4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;

5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, íons diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;

6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.

7 - Toda matéria-prima do produto é testado e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro humano é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.

8 - Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina).

Amostra(s) hemolisadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Para amostras que serão testadas em duplicata, o volume requerido é de 0,050 mL de soro diluído.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Diluente de soro :

Reconstituir o diluente (concentrado) para 200 mL de água destilada ou deionizada. Estocar entre 2 e 8°C.

IMPORTANTE

Contém solução salina e corante. Estocar entre 2 e 8°C.

O diluente de soro concentrado pode precipitar quando estocado entre 2 e 8°C. Isso é normal, por ser um reagente altamente concentrado. Quando isso ocorrer, antes de diluir o reagente, deixá-lo em temperatura ambiente até que se solubilize novamente.

2) Solução de lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco nº 6 (Lavagem Concentrada (◆)) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

3) Diluição das amostras de pacientes (1/100)

Em um tubo de ensaio, diluir 0,010 mL (10 µL) da amostra do paciente em 1 mL de diluente de soro, reconstituído previamente. Tampar o tubo e agitar no vortex ou homogeneizar manualmente por inversão. Pode ser conservado sob refrigeração, entre 2 e 8°C, por até 48 horas.

OBS: NÃO DILUIR OS CONTROLES, POIS JÁ ESTÃO PRONTOS PARA USO.

4) Substrato – Solução de trabalho

Determinar a quantidade necessária de cavidades a serem utilizadas para preparo de uma quantidade adequada. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B.

Para cada microcavidade (teste) :

50 µL de Substrato A + 50 µL de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes).

PREPARAR IMEDIATAMENTE ANTES DO USO. Usar no máximo até uma (1) hora após preparo.

TÉCNICA

Antes de começar o ensaio, colocar todos os reagentes, soros de referência (padrões) e controles em temperatura ambiente (15 - 30 °C).

1) Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles e amostras (podendo ser testados em duplicata.)

2) Pipetar 0,050 mL (50 µL) dos padrões, controles e amostras pré-diluídas em suas respectivas microcavidades.

3) Pipetar 0,100 mL (100 µL) de Conjugado Biotinilado de Tireoglobulina.

Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos.

4) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.

5) Descartar o conteúdo das microcavidades por decantação ou aspiração (lavadora).

6) Pipetar aproximadamente 300 µL de solução de lavagem **previamente preparada** em todas as microcavidades. (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO). Repetir esse passo para um total de cinco (5) ciclos de lavagens. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.

7) Pipetar 0,100 mL (100 µL) de conjugado em todas as microcavidades.

Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.

8) Incubar por trinta (30) minutos em temperatura ambiente.

9) Repetir os passos 5 e 6.

11) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Substrato **previamente preparado** (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO) em todas as microcavidades.

12) Incubar por 15 minutos em temperatura ambiente, **ao abrigo da luz.**

13) Pipetar 0,050 mL (50 µL) de solução de parada em todas as microcavidades.

Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.

14) Ler a absorvância de cada microcavidade em 450/630 nm em uma leitora de elisa. **Os resultados podem ser lidos em até trinta (30) minutos após a adição da solução de parada.**

Obs.: Para repetir testes de amostras com concentração maior que 2000 UI/mL, diluir 1:10 ou 1:50, usando as amostras já diluídas anteriormente. Para obter a concentração da amostra, multiplique o resultado pelo fator de diluição.

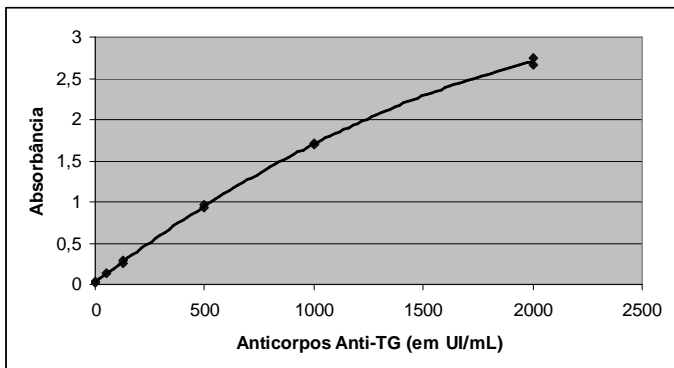
DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de Anticorpos Anti-TG em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da curva de calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na Leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1. Plotar as absorbâncias de cada padrão de referência versus a concentração correspondente de anti-TG em UI/mL em papel de gráfico linear (não calcule as médias das duplicatas antes de plotá-las no gráfico). Traçar a curva:

Padrões	Microcavidade	Absorbância
A (0 UI/mL)	1	0,022
	2	0,028
B (50 UI/mL)	3	0,135
	4	0,131
C (125 UI/mL)	5	0,280
	6	0,261
D (500 UI/mL)	7	0,962
	8	0,936
E (1000 UI/mL)	9	1,709
	10	1,698
F (2000 UI/mL)	11	2,739
	12	2,667



Os dados apresentados no exemplo 1 e figura 1 são apenas para ilustração e não podem ser usados em substituição à curva de calibração, que deve ser construída em cada ensaio.

LIMITAÇÃO DO PROCESSO

a) Performance do ensaio

Para uma boa reprodutibilidade dos resultados é importante que o tempo de reação de cada microcavidade seja constante. A pipetagem das amostras não pode se estender por mais de dez (10) minutos para evitar desvios no ensaio. Se for usada mais que uma (1) placa, é recomendável repetir a curva. Cada reagente de um ensaio deve ser do mesmo lote e estocado nas condições que são recomendadas. O início da reação cinética se dá após a adição do Substrato, e é encerrada na adição da solução de parada. A adição do Substrato e da solução de parada deve ocorrer na mesma seqüência para eliminar desvios de tempo durante a reação. Leitoras de ELISA lêem na vertical. Não toque o fundo das microcavidades. Lavagens inadequadas podem resultar em resultados imprecisos ou incorretos. Concentrações muito altas de Anti-TG em amostras de pacientes podem contaminar amostras próximas (arraste). Duplicatas incoerentes entre si são indicativo de contaminação. Repetir qualquer amostra de paciente com absorbância superior a 3,0.

b) Interpretação

Se é usado um programa para interpretar os resultados, é imprescindível que se estabeleça uma margem de erro de 10% para os resultados dos calibradores e amostras. A presença de anticorpos contra Tireoglobulina é confirmada quando a amostra apresenta nível superior a 125 UI/mL. O resultado, em conjunto com a atividade de Tireoperoxidase, deve ser usado na avaliação clínica da tireoide. Entretanto, conclusões clínicas não podem basear-se apenas neste teste, mas em um conjunto de manifestações clínicas do paciente e outros testes relevantes. A relação custo-benefício deve ser considerada no uso de ensaios de Tireoglobulina em conjunto com os de Anti-Tireoperoxidase. A larga prática da realização de ambos os testes tem sido questionada.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada Laboratório deve estabelecer valores de referência para controles clinicamente relevantes e monitorar a performance dos ensaios.

PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE:

Absorbância máxima (calibrador 2000 UI/mL) = 1,8 a 2,8

VALORES DE REFERENCIA

Valores normais para o BIOLISA-ANTI TG em UI/mL

Valores até 124 UI/mL

Valores acima de 125 UI/mL são considerados positivos para a presença de Anticorpos Anti-TG.

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O Biolisa Anti TG foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente. Foram utilizadas 07 amostras de população normal e portadores de tireoide de Hashimoto, doença de Graves, e carcinomas tireoideanos (19,5 A 332,0 UI/mL). A equação de regressão linear obtida foi $y = 0,9029x + 4,3403$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9994. Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens consecutivas com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (UI/mL)	20,58	70,84	303,90
Desvio Padrão (UI/mL)	0,89	2,92	13,70
Coeficiente de Variação (%)	4,33	4,13	4,51

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, durante 3 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados :

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (UI/mL)	20,90	70,65	305,55
Desvio Padrão (UI/mL)	0,33	0,26	1,58
Coeficiente de Variação (%)	1,58	0,37	0,52

Sensibilidade

A sensibilidade do Biolisa Anti TG é de 5 UI/mL.

Especificidade

Foram avaliadas interferências para ANA, DNA, TPO e anticorpos reumatóides e estas não foram detectadas.

SIGNIFICADO CLÍNICO

Este teste representa um avanço para a avaliação clínica, como uma ferramenta valiosa no diagnóstico da disfunção tireoidal. A quantificação de Auto-Anticorpos Anti-TG ainda auxilia no diagnóstico de doenças tireoidianas, como a Síndrome de Hashimoto e Doença de Graves. A presença de Anticorpos contra Tireoglobulina é característica de pacientes com tireoidite e tireotoxicose primária. Anteriormente, a quantificação de Anti-TG era feita por Hemaglutinação Passiva (PHA). Esses testes não têm a sensibilidade do Enzimaimunoensaio e são limitados por interpretações subjetivas. A alta sensibilidade do método ELISA permite a detecção de níveis subclínicos de anticorpos contra TG. Além disso, os resultados são quantificados por um espectrofotômetro, eliminando interpretações subjetivas.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação : 96 TESTES

Referências :

Volpé, R., Autoimunes disease of the endocrine system, Boca Raton FL, :CRC Press, 1990
Volpé, R., Clin. Chem., 40, 2132 (1994)
Breever K., et. Al., Clin. Chem., 35, 1949-54 (1989)
Mark T., Clin. Chem., 40, 2128 (1994)

GARANTIA DE QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
e-mail bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente Tel.: 0800 0315454.
e-mail: sac@bioclin.com.br

Número de registro do Kit de Biolisa Anti TG na ANVISA: 10269360172

Revisão: Junho/11