

FINALIDADE

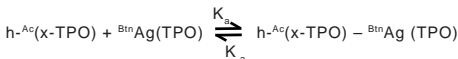
Teste para determinação quantitativa de Auto-Anticorpos AntiTireoperoxidase (TPO) em soro ou plasma humano, por Enzimaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrico

O teste BIOLISA ANTI TPO é altamente sensível e requer pouca manipulação técnica. Neste método, 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 de Antígeno Tireoperoxidase (TPO) e a reação é homogeneizada. O resultado da reação entre os autoanticorpos contra TPO e o Conjugado Biotinilado de Antígeno Tireoperoxidase (TPO) forma um imunocomplexo que é depositado na superfície das microcavidades revestidas com streptavidina, através da alta reatividade da biotina com a streptavidina.

Essa interação é demonstrada pela seguinte equação:



Onde:

$B^{tn}Ag(TPO)$ = Antígeno Biotina (constante)

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

$h^{-Ac}(x-TPO)-B^{tn}Ag(TPO)$ = 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 um gráfico de enzimas e anticorpos ativos (curva-padrão). A atividade enzimática das amostras desconhecidas (pacientes) é comparada com a curva-padrão, determinando-se o nível de anticorpos dessas amostras através da correlação das mesmas com a curva-padrão

REAGENTES

1) Padrões referência (A-F)

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

A= 0,0 UI/mL

B= 25,0 UI/mL

C= 50,0 UI/mL

D=100,0 UI/mL

E=250,0 UI/mL

F= 500,0 UI/mL .

2) Conjugado Biotinilado (v)

Antígeno Tireoperoxidase (TPO) biotinilado em solução e corante. Contém Azida sódica.

Estocar entre 2 e 8°C.

3) Conjugado Enzimático (E)

Anticorpo anti-humano IgG ligado a Peroxidase (HRP) em solução e corante. Contém Azida sódica.

Estocar entre 2 e 8°C.

4) Placa sensibilizada (↓)

Estocar entre 2 e 8°C.

5) Diluente de Amostra Concentrado (D)

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

6) Lavagem concentrada (♦)

Solução de fosfato salina, Ph 7,4 e azida sódica.

Estocar entre 2 e 8°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



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

APRESENTAÇÃO

REAGENTES	96 TESTES
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 acondicionada em embalagem de alumínio, com sílica (anti-umidade)	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 quadro anterior

-Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1) Pipeta(s) com capacidade de dispensar volumes de 25 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, ions 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.

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:

Em um tubo de ensaio :

- Pipetar 0,010 mL (10 µL) da amostra do paciente

-1 mL de diluente de soro, (reconstituído). Homogeneizar.

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 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, padrões referência 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 0,025 mL (25 µL) dos padrões, controles e amostras pré-diluídas em suas respectivas microcavidades.

3) Pipetar 0,100 mL (100 µL) da solução Conjugado Biotinilado de Antígeno Tireoperoxidase (TPO). **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).

Decantar ou aspirar, para um total de cinco (5) ciclos de lavagem. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.

7) Pipetar 0,100 mL (100 µL) de Enzima Conjugado Anti IgG em todas as microcavidades.

Homogeneizar gentilmente.

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

8)Repetir os passos 5 e 6.

9) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Substrato – Solução de trabalho, **previamente preparado** em todas as microcavidades.

(Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO)

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

11) Pipetar 0,050 mL (50 µL) de solução de parada em todas as microcavidades.
Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.

12) Ler a absorbância de cada microcavidade em 450 nm em uma leitora de placa. 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 500 UI/mL, diluir 1:5 ou 1:10, 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-TPO em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorbâncias obtidas na Leitora de elisa, como apresentado no exemplo 1.

Plotar as absorbâncias de cada padrão de referência versus a concentração correspondente de anti-TPO UI/mL em papel de gráfico linear (**não calcule as médias das duplicatas antes de plotá-las no gráfico**).

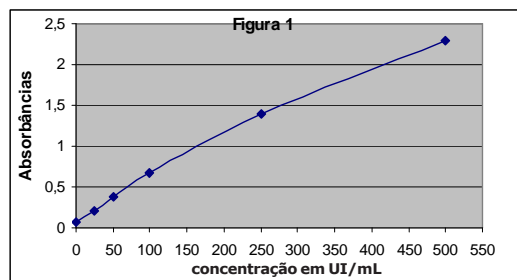
Traçar a curva .

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.

Exemplo 1

Padrões	Microcavidade	Absorbância
A (0 UI/mL)	1	0,068
	2	0,069
B (25 UI/mL)	3	0,209
	4	0,219
C (50 UI/mL)	5	0,380
	6	0,367
D (100 UI/mL)	7	0,691
	8	0,680
E (250 UI/mL)	9	1,400
	10	1,366
F (500 UI/mL)	11	2,312
	12	2,203

Figura 1



LIMITAÇÃO DO PROCESSO

a) Performance do ensaio

Para uma boa reprodutibilidade dos resultados, a pipetagem das amostras não pode se estender por mais de dez (10) minutos e assim, evitamos desvios no ensaio. Por isso, é importante que o tempo de reação de cada microcavidade seja constante. Se for usada mais que uma (1) placa, é recomendável repetir a reação.

A adição do Substrato inicia a reação cinética, que é encerrada pela adição da solução de parada. Logo, a adição do Substrato e da solução de parada deve ocorrer na mesma sequência para eliminar desvios de tempo durante a reação.

Leitoras de elisa lêem na vertical. Não toque no fundo das microcavidades.

Nas etapas de lavagem, observar que não ocorra falhas, pois podem resultar em imprecisões nos resultados ou incorreções.

Concentrações muito altas de Anti-TPO 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.

Não usar amostras contaminadas microbiologicamente.

b) Interpretação

Se for 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 Tireoperoxidase é confirmada quando a amostra apresenta nível superior a 40 UI/mL. O resultado, em conjunto com a atividade de Tireoglobulina, pode ser usado na avaliação clínica da tireóide. Entretanto, conclusões clínicas não podem basear-se apenas neste teste, mas em um conjunto de manifestações clínicas do paciente e outros testes relevantes.

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 500 UI/mL) = 1,5 a 2,7

VALORES DE REFERENCIA

Valores normais para o KIT BIOLISA Anti TPO em UI/mL

A presença de anticorpos contra Tireoperoxidase é confirmada quando a amostra apresenta nível superior a 40 UI/mL

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O BIOLISA ANTI TPO foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 07 amostras de população normal, com tireoidite de Hashimoto, Doença de Graves, e carcinomas tireoideanos (19,1 a 74,20 UI/mL).

A equação de regressão linear obtida foi $y = 1,1028x - 3,9169$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9921. 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)	20,28	70,63	5,22
Desvio Padrão (UI/mL)	0,99	2,84	0,25
Coefficiente de Variação (%)	4,88	4,03	4,71

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)	20,62	70,06	5,17
Desvio Padrão (UI/mL)	0,35	0,81	0,05
Coefficiente de Variação (%)	1,67	1,16	0,91

Sensibilidade

O KIT BIOLISA Anti TPO possui sensibilidade de 1,5 UI/mL.

Linearidade

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, a 500 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.

Especificidade

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

SIGNIFICADO CLÍNICO

A presença de Anticorpos contra Tireoperoxidase é característica de pacientes com tireoidite de Hashimoto (95%), edema idiopático (90%) e Doença de Graves (80%). De fato, 72% dos pacientes positivos para Anti-TPO apresentam algum grau de disfunção tireoidal. Este teste representa um avanço para a avaliação clínica, como uma ferramenta valiosa no diagnóstico da disfunção tireoidal.

No passado, a quantificação de Anti-TPO 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 BIOLISA ANTI TPO permite a detecção de níveis subclínicos de anticorpos contra TPO. Além disso, os resultados são quantificados, eliminando interpretações subjetivas.

APRESENTAÇÃO

96 testes

Referências :

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

GARANTIA DA 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 Biolisa Anti TPO na ANVISA: 10269360166

Revisão: Junho/11