

# Bioclin

## Biolisa TSH

### K100

#### INSTRUÇÕES DE USO

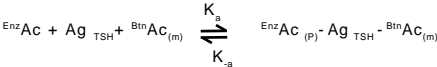
##### FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de concentração de Tirotropina, em soro humano, por Enzimaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

##### PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

Nesta metodologia são pipetados inicialmente, nas respectivas microcavidades da placa, os padrões de referência (padrões), amostras de pacientes e controles. Em seguida, adiciona-se o Conjugado Enzimático Policlonal e Anticorpos Biotina monoclonal anti TSH e a reação é homogeneizada. Da interação entre o Conjugado Biotina monoclonal, os anticorpos imobilizados nas microcavidades e uma amostra contendo o antígeno nativo, resulta um complexo sanduíche solúvel. Essa interação é ilustrada pela seguinte equação:



##### Onde:

$\text{B}^{\text{In}}\text{Ac}_{(\text{m})}$  = Anticorpo Biotina monoclonal (excedente)

$\text{Ag}_{\text{TSH}}$  = Antígeno nativo (variável)

$\text{Enz}^{\text{Ac}}_{(\text{p})}$  = Conjugado enzimático de Anticorpo policlonal (excedente)

$\text{Enz}^{\text{Ac}}_{(\text{p})} - \text{Ag}_{\text{TSH}} - \text{B}^{\text{In}}\text{Ac}_{(\text{m})}$  = Complexo sanduíche antígeno-anticorpo

$\text{K}_a$  = razão constante de associação

$\text{K}_{-a}$  = razão constante de dissociação

Após completado o período de incubação, o anticorpo aderente Conjugado Enzimático-TSH é separado do antígeno não aderente por aspiração ou decantação. A atividade enzimática na superfície da microcavidade é quantificada pela reação de cor, produzida com substrato.

O uso de diversos padrões de referência de concentrações conhecidas de TSH permite a construção de um gráfico de atividade e concentração. A atividade enzimática das amostras desconhecidas (pacientes) é comparada com a curva de calibração, determinando-se a concentração dessas amostras através da correlação das mesmas com a curva de calibração.

##### REAGENTES

###### 1 - Padrões referência

Sete (7) frascos (**A-G**) de Padrões referência contendo TSH em diferentes concentrações em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica.:

A= 0,0 µUI/mL

B= 0,5 µUI/mL

C= 2,5 µUI/mL

D= 5,0 µUI/mL

E= 10,0 µUI/mL

F= 20,0 µUI/mL

G= 40,0 µUI/mL

###### 2-Conjugado ( E )

Enzima purificada ligada com anticorpo, IgG monoclonal biotinilado de rato, em solução e corante. Contém azida sódica. Estocar entre 2 e 8° C

###### 3 - Placa Sensibilizada ( ↓ )

Estocar entre 2 e 8° C.

###### 4 - Lavagem concentrada ( ♣ )

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

###### 5 - Substrato A ( S^A )

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

###### 6 - Substrato B ( S^B )

Solução de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estocar entre 2 e 8°C.

###### 7 - Solução de parada



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

##### APRESENTAÇÃO

Apresentação	1	2
REAGENTES	96 microcavidades	192 microcavidades
1 - Padrões Referência	7 Frascos A - G x 1,0 mL	7 Frascos A - G x 1,0 mL
2 - Conjugado	1 Frasco x 13 mL	2 FrascoS x 13 mL
3 -Placa sensibilizada	1 Unidade x 96 poços	2 Unidades x 96 poços
4 - Lavagem concentrada	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 20 mL
5 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
6 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
7 - Solução de Parada	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos 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 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, 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 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

As precauções e tipos usuais de punção venosa devem ser observadas na coleta das amostras. Para melhor parâmetro de comparação com valores normais, colher a amostra à primeira hora da manhã. Colher em tubo sem aditivos. Separar as células vermelhas por centrifugação e usar o soro obtido para o ensaio de TSH.

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 cinco (5) dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de cinco dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Se o ensaio for feito em duplicata, o volume necessário de amostra é de 0,100 mL.

##### DESCRIÇÃO DO PROCESSO

###### PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

###### 1) Solução de lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco n° 4 (Lavagem Concentrada **Ícone** : ♣) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

###### 2) 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, amostras, padrões referência e controles (se houver) para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30 °C).

- 1)Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles (se houver) e amostras (podendo ser testados em duplicata.)
- 2) Pipetar 0,050 mL (50 µL) dos padrões, controles (se houver) e amostras em suas respectivas microcavidades.

\*\*\* Para uma reação de TSH ultrasensível (<0,5 µUI/mL), excluir o calibrador de 40µUI/mL, pois pode apresentar absorvância superior a 3 unidades de absorvância.

- 3) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Conjugado enzima-anticorpo biotinizado em todas as microcavidades. Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos

- 4) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.

\*\*\* Para uma reação de TSH ultrasensível (<0,5 µUI/mL), **incubar por 120 minutos** em temperatura ambiente.

- 5) Descartar o conteúdo das microcavidades por aspiração (Lavadora), ou decantação;

- 6) Pipetar aproximadamente 300 µL de solução de lavagem previamente preparada em todas as microcavidades.

(Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO ).

Decantar ou aspirar (lavadora), 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) do Substrato **previamente preparado** em todas as microcavidades.

(Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).

- 8) Incubar por quinze (15) minutos em temperatura ambiente, **ao abrigo da luz.**

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

**Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.**

- 10) 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.

##### DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de TSH em amostras desconhecidas (pacientes).

###### Preparo da Curva de Calibração

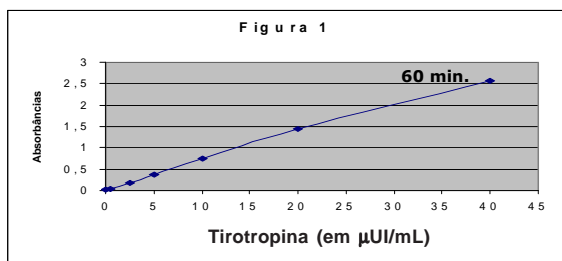
Registrar as absorvâncias obtidas na Leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1.

Plotar as absorvâncias de cada padrão referência versus a concentração correspondente de TSH em µUI/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 (0,0 µUI/mL)	1	0,011
	2	0,009
B (0,5 µUI/mL)	3	0,034
	4	0,033
C (2,5 µUI/mL)	5	0,177
	6	0,175
D (5,0 µUI/mL)	7	0,377
	8	0,366
E (10,0 µUI/mL)	9	0,743
	10	0,748
F (20,0 µUI/mL)	11	1,452
	12	1,431
G (40,0 µUI/mL)	13	2,633
	14	2,530



## LIMITAÇÃO DO PROCESSO

### a) Performance do ensaio

É muito importante que o tempo de reação de cada microcavidade seja constante para a boa reprodutibilidade dos resultados. 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.

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. Portanto, não toque o fundo das microcavidades.

Falhas no processo de lavagem podem resultar em resultados imprecisos ou incorretos.

Cada reagente de um ensaio deve ser do mesmo lote e estocado em condições idênticas.

### 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 concentração sérica de Tirotopina depende de múltiplos fatores: função da glândula do hipotálamo, função da glândula da tireóide, resposta da pituitária ao estímulo do TRH. A concentração sérica de TSH Total não constitui, isoladamente, parâmetro para diagnóstico clínico.

Os valores de TSH podem ser elevados por intervenções farmacológicas, como o uso de Domperidona, fenobarbital e fenitoína. Por sua vez, o decréscimo nos valores de TSH Total estão relacionados a administração de propranolol, dopamina e d-tiroxina. Variações de ordem genética ou degradação de TSH em subunidades podem afetar as características de ligação dos anticorpos e influenciar o resultado final. Tais amostras, normalmente apresentam resultados diferentes entre vários ensaios e métodos, em virtude da reatividade dos anticorpos envolvidos.

## "NÃO USAR O KIT BIOLISA TSH PARA TRIAGEM EM RECÉM-NASCIDOS."

## CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada Laboratório deve estabelecer valores de referência para níveis de hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo e monitorar a performance dos ensaios.

## PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE:

Absorbância máxima (calibrador 40 µUI/mL) = 1,8 a 2,7

## VALORES DE REFERÊNCIA

### Valores normais para o KIT BIOLISA-TSH em mUI/mL

Varição baixa (low) normal :	0,39
Varição alta (high) normal :	6,16
Menor que 5 anos	0,3 – 7,0 µUI/mL
Maior que 5 anos	0,39 – 6,16 µUI/mL

## DESEMPENHO DO PRODUTO

### Exatidão

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O Biolisa TSH foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 07 amostras de população hipotireóide, eutireóide e hipertireóide (0,01 A 41 µUI/mL). A equação de regressão linear obtida foi  $y = 1,0468x - 0,194$  e o coeficiente de correlação igual a 0,9963. 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 (µUI/mL)	2,05	12,59	31,00
Desvio Padrão (µUI/mL)	0,10	0,58	1,08
Coefficiente de Variação (%)	4,70	4,59	3,48

## 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 (µUI/mL)	2,08	12,47	30,98
Desvio Padrão (µUI/mL)	0,05	0,12	0,25
Coefficiente de Variação (%)	2,20	0,96	0,81

## Sensibilidade

Sensibilidade (limite de detecção), estabelecida determinante de variação do calibrador de 0 µUI/mL :

\* Para uma hora de incubação : 0,078 µUI/mL.

\* Para duas horas de incubação : 0,027 µUI/mL.

## Correlação entre 1 hora e 2 horas de incubação

Os procedimentos de uma e duas horas de incubação foram comparados. Foram utilizadas (30) trinta amostras (variação de 0,1 a 18,5 µUI/mL). A equação de regressão pelo método dos mínimos quadrados ( $y = mx + b$ ) e o coeficiente de correlação foram utilizados para comparar os dois procedimentos. Excelente compatibilidade é evidenciada pelo coeficiente de correlação, inclinação e intercepto:

$$Y = 0,986(x) + 0,119 \quad \text{Correlação} = 0,998$$

## Linearidade

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, diluir a mesma com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

## Especificidade

As reações cruzadas de TSH com determinadas substâncias, foram avaliadas com adição de interferentes em um padrão, em várias concentrações. As reações cruzadas foram calculadas pela razão entre uma dosagem de substância interferente e a dosagem de TSH necessária para produzir a mesma absorbância.

Substância	Reações Cruzadas	Concentração
Tirotopina (hTSH)	1,0000	---
H. Folículo Estimulante (FSH)	< 0,0001	1000 ng/mL
Hormônio Luteinizante (LH)	< 0,0001	1000 ng/mL
Gonadotropina C. Humana (hCG)	< 0,0001	1000 ng/mL

## SIGNIFICADO CLÍNICO

O aumento na concentração sérica de TSH é responsável primário pela síntese e produção dos hormônios da tireóide. Sendo, assim, um indicador sensível e precoce do decréscimo das reservas da tireóide e em conjunto com o decréscimo de concentração de T4, constitui diagnóstico de hipotireoidismo primário. A elevação nos valores de TSH demonstra o clássico sistema de retroalimentação negativa entre a pituitária e as glândulas da tireóide. Isso significa que uma falha na glândula da tireóide reduz as secreções hormonais, ao mesmo tempo que estimula a liberação de TSH pela pituitária.

A quantificação de TSH também é usada para diferenciar os hipotireoidismos secundário (pituitária) e terciário (hipotálamo) da doença primária da tireóide. A liberação de TSH pela pituitária é regulada pelo fator de liberação de Tirotopina (THR), secretado pelo hipotálamo e pela ação direta dos hormônios da tireóide T4 (Tiroxina) e T3 (Triiodotironina). O decréscimo de valores de T3 e T4 reduz a responsabilidade da pituitária pelo efeito estimulatório do TRH. No hipotireoidismo secundário e terciário, as concentrações de T4 são usualmente baixas e o nível de TSH, geralmente, baixo ou normal. Nem a deficiência pituitária de TSH (hipotireoidismo secundário), nem a estimulação insuficiente da pituitária pelo TRH (hipotireoidismo terciário) são as causas disto. O teste de estimulação do TRH diferencia essas condições. No hipotireoidismo secundário, a resposta do TSH ao estímulo de TRH é direta, enquanto que no hipotireoidismo terciário a resposta é retardada.

Os ensaios imunoenzimáticos trouxeram aos laboratórios sensibilidade técnica suficiente para diferenciar a população hipotireóide da população eutireóide, estendendo-se as propriedades da metodologia para a quantificação do TSH. Esse método é um ensaio de segunda geração, que fornece as médias para delimitar as margens entre hipertireoidismo e eutireoidismo.

## NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 - 96 Testes

Apresentação 2 - 192 Testes

## Referências :

- 1-Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine."
- 2-Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948)
- 3-Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyrotropin."
- 4-Journal Clinical Endocrinol., 33,865 (1971)
- 5-Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U. "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests."
- 6-Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975)
- 7-Spencer, CA, et. Al., "Clinical Chemistry, "Interlaboratory/Intermethod differences in Funcional Sensitivity of Immunometric Assaya of Thyrotropin (TSH) and Impact on Reliability of Measurement of Subnormal Concentrations of TSH"41, 367 (1995)

## 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 de Biolisa TSH na ANVISA: 10269360167

Revisão: Junho/11