

## RSR Anti-TPO

### Ensaio Direto para auto-anticorpos tireóide peroxidase (TPO)

Revisão: 28/05/2009

#### PRINCÍPIO DO ENSAIO

A destruição auto-imune da tireóide está associada à formação de auto-anticorpos contra a enzima tireóide peroxidase (TPO) e a principal proteína da tireóide a tireoglobulina (Tg). A dosagem dos auto-anticorpos Tg e TPO é de grande valor no diagnóstico de doenças auto-imunes da tireóide. O ensaio direto RSR para auto-anticorpos TPO se baseia em preparações altamente purificadas de TPO marcado com <sup>125</sup>I. No ensaio, o soro diluído é incubado com TPO marcado com <sup>125</sup>I e são formados complexos antígeno-anticorpo marcados. Então, os complexos são precipitados pela adição de proteína A em fase sólida seguida de centrifugação. Após centrifugação, os precipitados formados são contados e a quantidade de radioatividade é proporcional à concentração de auto-anticorpo TPO presente na amostra.

#### Reagentes fornecidos para kits de 50,100 e 500 tubos

Material	50 TUBOS	100 TUBOS	500 TUBOS
<sup>125</sup> I TPO	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL	5 x 5 mL
Calibradores	7 x 1 mL	7 x 1 mL	14 x 1 mL
Proteína A	1 x 2.6 mL	2 x 2.6 mL	5 x 5 mL
Diluyente de amostra	1 x 110 mL	1 x 110 mL	2 x 500 mL

#### Materiais necessários e não fornecidos no kit:

1. Pipetas para 50 µL, 1 mL, 2.6 mL e 5 mL.
2. Tubos plásticos (3 mL).
3. Misturador Vórtex.
4. Centrífuga refrigerada com capacidade de velocidade a 1500 g.
5. Contador *Gamma* para [I-125].

#### PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Neste formato de ensaio, soro diluído e antígeno marcado são pré-incubados antes da adição da proteína A em fase sólida.

- Reconstituir o TPO liofilizado marcado com <sup>125</sup>I adicionando-se o diluyente de ensaio (consulte a tabela para os volumes de reconstituição). Após reconstituição, o TPO marcado pode ser armazenado de 2-8°C.

- Reconstituir a Proteína A liofilizada com o diluyente de ensaio no volume adequado (veja a tabela; utilizar pipeta). Homogeneizar em vórtex por 10 segundos e verificar se a suspensão está uniforme. Após reconstituição, a suspensão pode ser armazenada de 2-8°C. Para períodos mais longos, até 6 meses, armazenar a -20°C. Ocorre precipitação no frasco armazenado, este deve ser homogeneizado gentilmente por inversão por cerca de 20 segundos antes do seu uso no ensaio. **Não é necessário** homogeneizar o frasco enquanto está sendo realizada a pipetagem. Ciclos repetidos de congelamento devem ser evitados.

Os reagentes devem estar à temperatura ambiente, deixá-los na bancada por pelo menos 30 minutos antes de iniciar o ensaio.

1. Diluir todas as amostras na proporção de **1:20** com o diluyente de ensaio (ex. 50 µL de soro para 1 mL de diluyente de ensaio). **Não dilua os padrões (estão prontos para uso).**
2. Adicionar **50 µL** dos padrões em duplicata e **50 µL** dos soros diluídos em duplicata nos tubos plásticos (3 mL) devidamente identificados.
3. Adicionar **50 µL** de TPO marcado com <sup>125</sup>I em todos os tubos. Incluir dois tubos para a contagem TOTAL e pipetar **50 µL** de <sup>125</sup>I.
4. Agitar todos os tubos em vórtex por alguns segundos, cobrir os tubos e incubá-los por **1 hora** a temperatura ambiente.
5. Homogeneizar por inversão a **proteína A** em suspensão por cerca de 20 segundos. Pipetar **50 µL** desta suspensão homogeneizada em cada tubo (**exceto nos tubos TOTAIS**).
6. Agitar os tubos no vórtex, cobrir e incubá-los por **1 hora** a temperatura ambiente.

7. Após incubação, adicionar 1 mL do diluyente de ensaio em cada tubo (Exceto nos tubos TOTAIS).
8. Agitar em vórtex e centrifugar a 1500 g por **30 minutos** a 4°C.
9. Após centrifugação, aspirar o sobrenadante
10. Contar o precipitado dos tubos das amostras e os tubos de contagem TOTAL por 1 minuto.

#### CALCULO DOS RESULTADOS:

A média de radioatividade (CPM) em cada conjunto de tubos em duplicata é usada diretamente ou como uma porcentagem de radioatividade total adicionada. Uma curva padrão é então construída utilizando-se a concentração de anticorpo na ordenada e a média de CPM ou porcentagem de ligação do tracer na abscissa. As concentrações nos soros testados são lidas então nesta curva. 1 unidade por mL de TPOAb nos padrões do kit é equivalente a 5 unidades por mL da preparação de referência NIBSC 66/387.

#### Resultados Esperados:

Estes dados não devem ser substituídos pelos resultados obtidos no laboratório.

Calibrador u/mL	% <sup>125</sup> I TPO
Total counts (cpm)	49,225
0	1,4
0,3	3,0
1	10,4
3	31,6
10	71,0
30	86,9
100	90,1

#### CUT OFF:

Cut off	u/mL
Negativo	≤ 0,3 u/mL
Positivo	>0,3 u/mL

#### Especificidade clínica:

Amostras de 107 doadores de sangue saudáveis foram analisadas, 106 (99%) foram identificadas com negativas para auto anticorpos TPO. Em outro estudo, 100 indivíduos saudáveis (50 do sexo masculino e 50 do sexo feminino) foram analisados para TPOAb RIA, 94% e 98% respectivamente foram negativos para TPO auto anticorpos.

#### Sensibilidade Clínica

Amostras de 50 pacientes diagnosticados tanto com doença de Hashimoto quanto com doença de Graves foram analisadas. 49 (98%) foram identificadas como positivas para TPO auto anticorpos.

#### Limite de detecção inferior:

A menor concentração (0 u/mL) foi analisada 20 vezes e calculados média e desvio padrão. O limite de detecção inferior mais +2 desvios padrões foi de 0,03u/mL.

#### Precisão inter ensaios:

Amostra	u/mL (n=25)	CV (%)
1	1.0	8.2
2	16.1	10.2

#### Precisão intra ensaios:

Amostra	u/mL (n=20)	CV (%)
3	3.9	3.6
4	12.8	2.7

#### Considerações de Segurança:

- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios intervalos de referência para auto-anticorpos TPO, tanto para pacientes normais quanto patológicos.
- Os dados contidos nestas instruções devem ser usados apenas como um guia.
- Recomenda-se que cada laboratório inclua seu próprio painel de amostras controles juntamente com os controles fornecidos no kit.
- Este kit é destinado ao uso *in vitro* por profissionais habilitados.
- Siga todas as instruções cuidadosamente.
- Armazene todos os reagentes de 2-8°C nas embalagens originais.
- Verifique as datas de validade impressas nas etiquetas assim como as estabilidades específicas para cada reagente reconstituído.



## **CUIDADO: MATERIAL RADIOATIVO**

Consulte as regulamentações de radiação, padrões, e procedimentos aplicáveis para a sua facilidade em manusear, armazenar, e descartar materiais radioativos.

Este material radioativo deve ser recebido, adquirido, e usado somente por médicos, laboratórios clínicos ou hospitais e somente deve ser usado para testes de laboratório ou clínicos *in vitro* que não envolvam administração interna ou externa do material, ou da radiação dele resultante, para seres humanos e animais. O seu recebimento, aquisição, uso e transferência estão sujeitos a regulamentações de cada país.

Para minimizar os riscos de exposição à radiação, manuseie materiais radioativos como recomendado pela regulamentação padrão apropriada e no "Occupational Radiation Protection Safety Guide, Safety Standards Series Nº RS-G-1.1," 1999, publicado pela "International Atomic Energy Agency".

As seguintes Boas Práticas de Laboratório universais devem ser observadas:

- Não comer, beber, fumar ou aplicar cosméticos na área onde os materiais radioativos estiverem sendo manipulados.
- Não pipetar com a boca.
- Usar aventais e luvas descartáveis quando manipular material para diagnóstico.
- Lavar muito bem as mãos após manipular material de diagnóstico.
- Cobrir a superfície de trabalho com papel absorvente descartável.
- Limpar todos os respingos muito bem e imediatamente e descontaminar a superfície afetada.
- Evite a geração de aerossol.
- Providencie ventilação adequada.
- Manuseie e descarte os reagentes e materiais de acordo com a regulamentação aplicável.

## **AVISO: Material Potencialmente Nocivo à Saúde**

Este kit contém alguns reagentes fabricados com material de fonte humana (ex. soro ou plasma) ou usados em conjunto com materiais de fonte humana. O material neste kit foi testado por métodos recomendados pela FDA e não se apresentaram reativos para anticorpo HIV-1/2, HCV e HBsAg. Nenhum método pode oferecer completa garantia de eliminação de riscos potenciais à saúde. Estes reagentes devem ser manipulados no Nível de Biosegurança 2, conforme recomendado para qualquer amostra de sangue ou soro potencialmente infecciosa no manual do CDC/NIH "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (Biosegurança em Laboratórios Microbiológicos e Biomédicos), 4ª Edição, Abril 1999.

## **CUIDADO: Perigo Químico:**

Alguns dos reagentes neste kit contém azida sódica como conservante em concentrações abaixo do limite permitido de <0.1%. Mesmo significativamente diluída azida sódica concentrada é um irritante para a pele e membranas mucosas e pode reagir com o cobre e chumbo das tubulações e formar azidas metálicas explosivas, especialmente se acumulada. Esta substância está sob a forma diluída, e por isto, pode minimizar os riscos de exposição significativamente, mas não completamente. Evite contato com a pele, olhos, e roupas. Em caso de contato com qualquer um destes reagentes, lave a área completamente com água e procure orientação médica. Descarte todo material não radioativo e os reagentes sem risco de contaminação deixando correr uma grande quantidade de água a fim de prevenir a formação de produtos químicos perigosos no sistema de tubulação.

Para maiores informações a respeito de substâncias de risco pertencentes a este kit, por favor, consulte os componentes específicos nas FISPQs no site [www.gendiaq.com.br](http://www.gendiaq.com.br) ou solicite a informação.

**Revisão-assessoria: 30/06/2009.**

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828

**Reg. MS: 10337680096**

Para uso diagnóstico *in vitro*.

Material Radioativo. Não é destinado ao uso interno ou externo em seres humanos ou animais.

Contém material de origem humana. Potencialmente infectante.

**CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C**

**Importado e distribuído por:**

**Genese Produtos Diagnósticos Ltda.**

Rua Diogo Vaz, 291 – CAMBUCI

CNPJ. 68.384.155/0001-02

CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

**Fabricado por:**

**RSR Limited**

Avenue Park

Pentwyn – Cardiff CF2 7HE

Wales – REINO UNIDO

**Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341-6987**

