

R S R LIMITED

AVENUE PARK
PENTWYN
CARDIFF
CF 23 8HE
UNITED KINGDOM

TELEPHONE: (029) 2073 2076
FACSIMILE: (029) 2073 2704

Revisão: 15/12/2003

ENSAIO DE AUTO-ANTICORPOS PARA RECEPTORES DE TIREOTROFINA (TRAb)

Princípio do Ensaio

O hipertiroidismo na Doença de Graves é adquirido através de auto-anticorpos contra receptores de tirofina (TSH) e a dosagem destes anticorpos é útil no diagnóstico e acompanhamento de hipertiroidismo de Graves.

Este kit fornece um método simples, sensível e específico para a dosagem de auto-anticorpos para receptores de TSH (TRAb) em amostras de soro de pacientes. No ensaio, TRAb inibe a ligação do TSH marcado [I^{125}] aos receptores de TSH em detergente solúvel de um modo dose dependente, e os níveis de TRAb são lidos em uma curva padrão ou expressos como um índice de inibição. Sobre ótimas condições, o kit detectará TRAb em quase todos pacientes com hipertiroidismo de Graves.

Componentes do kit e Armazenamento

Armazene os kits fechados sempre de 2-8°C.

Receptores de TSH devem ser reconstituídos imediatamente antes do uso no ensaio com tampão de ensaio gelado (0-4°C). Nunca permita que os receptores reconstituídos alcance temperaturas acima de 4°C antes do uso no ensaio.

TSH marcado com [I^{125}] deve ser reconstituído com tampão de ensaio gelado (0-4°C) e usado no ensaio no mesmo dia. Mantenha de 0-4°C antes do ensaio.

Soro liofilizado deve ser reconstituído com água destilada (consulte o rótulo para o volume correto de reconstituição) e armazenado de 2-8°C até a validade do kit.

Soro Negativo, tampão de ensaio, receptores controles e solução precipitante Devem ser armazenados de 2-8°C. Alguns kits são fornecidos com soro negativo liofilizado e devem ser reconstituídos com água destilada e armazenados de 2-8°C até a data de vencimento.

Reagentes fornecidos

- TSH marcado com [I^{125}]** (9KBq por frasco), liofilizado; cada frasco é suficiente para 25 tubos (100µL por tubo). (2 frascos para kits com 50 tubos; 4 frascos para kits com 100 tubos).
- Receptores de TSH** liofilizados; cada frasco é suficiente para 25 tubos (50µL por tubo). (2 frascos para kits com 50 tubos; 4 frascos para kits com 100 tubos).
- 1 frasco de **soro Negativo**; (1 mL)
- Tampão de ensaio** (10mL por frasco) para reconstituir TSH [I^{125}] e receptores de TSH. (1 frasco para kits de 50 tubos; 2 frascos para kits de 100 tubos).
- 2 frascos de soro controle**; (0,5 mL por frasco); valores para os controles são fornecidos em informativo separado.
- 1 frasco de **receptores controle**; (1 mL).
- Solução precipitante** (16,5 % de PEG); cada frasco é suficiente para 50 tubos (2 mL por tubo). (1 frasco para kits com 50 tubos; 2 frascos para kits com 100 tubos).

Item Opcional

- Calibradores de Ensaio; 5 frascos, 5, 15, 45, 135 e 405 unidades por litro (0,5 mL por frasco).

Equipamento necessário não fornecido

- Pipetas para 50 µL, 100 µL, 500 µL e 2 mL.
- Tubos plásticos de 4 mL e estante para tubos.
- Agitador vórtex
- Centrífuga refrigerada com capacidade de 1500g a 4°C.
- Sistema para aspiração ou decantação dos tubos de ensaio após centrifugação.
- Contador Gama

Armazenamento e Preparação das amostras de soro

O soro a ser analisado deve ser ensaiado logo após a sua separação ou deve ser armazenado (de preferência em alíquotas) a -20°C ou temperatura inferior. 0,2 mL é suficiente para um ensaio. Repetidos congelamentos e degelos devem ser evitados. Armazenamento incorreto das amostras de soro pode acarretar uma diminuição da atividade do TRAb. Não utilize amostras intensamente hemolisadas ou lipêmicas. **Não utilize plasma no ensaio.**

Quando necessário, descongele as amostras a temperatura ambiente e homogeneize gentilmente para assegurar a homogeneidade. Centrifugue o soro antes do ensaio (de preferência por 5 minutos de 10-15.000g) para remover qualquer partícula em suspensão. **Por favor, não omita este passo de centrifugação.**

Procedimento de Ensaio sem Calibradores

Os reagentes necessários são: Soro teste, soro controle do kit, soro negativo, tampão de ensaio, receptores controle, receptor de TSH, TSH [I^{125}] e precipitante:

- Calcule o número de frascos de TSH [I^{125}] e receptores de TSH necessários para o ensaio. Cada frasco é suficiente para 25 tubos e todos os soros e controles devem ser ensaiados em duplicata. Como nenhum calibrador é utilizado neste tipo de ensaio, são necessários apenas 4 tubos para pontos de referência (soro negativo + receptores de TSH e soro negativo + receptores controle; receptores controle fornecem valores de ligação não específica no ensaio).
- Esteja certo de que todos os reagentes estão gelados, de preferência de 0-4°C (utilização de um banho de gelo é altamente recomendada, porém uma pequena caixa de isopor contendo gelo reciclável pode ser utilizada para manter os reagentes gelados).
- Numere os tubos de ensaio utilizando 2 tubos para cada amostra e controles do kit; 2 tubos para cada um dos 2 pontos de referência (soro negativo + receptor de TSH e soro negativo + receptores controle) e 2 tubos para as contagens Totais.
- Pipete 50 µL de cada amostra e soro controle do kit nos tubos apropriados.
- Pipete 50 µL do soro negativo nos 4 tubos numerados (2 tubos para receptores de TSH; 2 tubos para receptores controles).
- Reconstitua cada frasco de receptor de TSH que será usado no ensaio com 1,3 mL de tampão de ensaio gelado. **Não reconstitua** os frascos de receptor de TSH que não serão utilizados imediatamente no ensaio, pois receptores reconstituídos não são muito estáveis. Com o frasco tampado, homogeneize em vórtex por 5 segundos para garantir a dissolução dos receptores. Use imediatamente após reconstituição. **Nunca deixe os receptores reconstituídos a temperatura ambiente.**
- Pipete 50 µL dos receptores em todos os tubos **exceto** aos tubos de receptor controle e tubos de contagem total.
- Pipete 50 µL de receptores controle nos tubos de receptores controles.
- Homogeneizar os tubos agitando a estante de tubos vigorosamente por cerca de 10 segundos ou agitando cada tubo em vórtex por 1 segundo. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (20-25°C).
- Durante a primeira fase de incubação, reconstitua cada frasco de TSH [I^{125}] que será utilizado no ensaio com 2,7 mL de tampão de ensaio gelado. Homogeneizar suavemente.

11. Adicione 100 µL de TSH [125] a cada tubo inclusive aos 2 tubos de contagem total. Homogeneizar agitando os tubos por cerca de 10 segundos (ou por 1 segundo em vórtex). Cubra os tubos e incube por 2 horas a temperatura ambiente (20-25°C). Alternativamente, incube por 1 hora em estufa a 35°C. **O uso de banho-maria não é recomendado.**

12. Adicione 2.0 mL de **solução precipitante** gelada (2-8°C) (utilize Eppendorf Multipipette se possível) em cada tubo (exceto aos tubos de contagem total) e homogeneize cada tubo por 10 vezes rapidamente em agitador vórtex ajustado a velocidade máxima (o conteúdo dos tubos devem ser homogeneizados neste estágio).

13. Centrifugue todos os tubos (exceto os tubos de contagem total) a 1500g por 30 minutos a 4°C e aspire ao sobrenadante (pode ser decantado, mas a aspiração é preferível). Conte o precipitado (e tubos de contagem total) por 2 minutos cada.

Cálculo dos Resultados

Os pontos de referencia para o ensaio são determinados usando-se o soro negativo fornecido. Ligação não específica (NSB) é adquirida através da % de TSH marcado ligado (precipitado) nos receptores controles na presença do soro negativo.

Resultados do ensaio são expressos em termos de inibição do TSH ligado calculado como a seguir:

$$100 \times \left[1 - \frac{\text{TSH marcado especificamente ligado na presença de amostras de soro}}{\text{TSH marcado especificamente ligado na presença de soro negativo}} \right]$$

Os pontos de referencia para o ensaio são determinados utilizando o soro negativo fornecido. Ligação não específica (NSB) é obtida como a % de TSH marcado ligado (precipitado) para os receptores controle na presença do soro negativo.

Alguns resultados típicos de ensaio são mostrados na tabela 1. Em nosso laboratório, soros de pessoas normais deram valores menores que 8 para inibição de TSH ligado e amostras que tiveram valores maiores que 10 são consideradas detectáveis por conter atividade de anticorpos receptores de TSH. De qualquer forma é essencial que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de normalidade para o ensaio

Tabela 1. Resultados Típicos do Ensaio

(Somente exemplo; os valores mostrados não devem ser utilizados para calcular os resultados dos pacientes atuais.)

Nº do Tubo	Conteúdo dos Tubos	Contagens em 2 min.	Inibição do TSH ligado	Com. TRAb (U/L)
1&2	Contagem total	35.835		
3&4	Soro Negativo Controle	14.074		
5&6	Calibrador 5 u/L	12.600	12	
7&8	Calibrador 15 u/L	11.327	22	
9&10	Calibrador 45 u/L	9.282	38	
11&12	Calibrador 135 u/L	6.068	63	
13&14	Calibrador 405 u/L	3.858	81	
15&16	Soro Paciente A	10.144	31	30.5
17&18	Soro Paciente B	8.048	48	72
19&20	Controle I kit	11.495	20	12.5
21&22	Controle II kit	7.826	49	75

Limitações e Precauções

1. Amostras intensamente hemolisadas ou lipêmicas não devem ser usadas. **Não utilize plasma.**
2. Sempre centrifugue os soros imediatamente antes do uso no ensaio.
3. Soros que parecem conter componentes radioativos devem ser monitorados quanto à radioatividade antes do ensaio.
4. Concentrações de TSH maiores que 100µU por mL pode interferir no ensaio.

5. Soro com concentrações de proteínas abaixo ou acima do normal fornecem resultados errôneos.

6. Sempre armazene os soros congelados com cuidado e não permita que ocorram aumentos de temperatura acima de -20°C. Armazenamento incorreto pode levar a uma diminuição da atividade de TRAB.

Características do Ensaio

1. Ligação não específica do tracer no ensaio deve ser menor que 15%.
2. Ligação do tracer aos receptores na presença de soro negativo deve ser maior que 25%.

PROCEDIMENTO DE ENSAIO COM CALIBRADORES

(Os calibradores são fornecidos como um opcional extra)

Cada kit contém um conjunto de calibradores de ensaio os quais contêm TSH biologicamente ativo. Os calibradores foram padronizados no ensaio receptor contra MRC LATS padrão B e 1 unidade de calibrador é aproximadamente equivalente a 1 unidade de padrão MRC LATS B.

O procedimento recomendado para ensaio com calibradores é o seguinte:

1. Remova as tampas de cada calibrador (5-405 unidades por litro) e reconstitua adicionando 0.5 mL de água destilada em cada frasco com uma pipeta. Recoloque as tampas em homogeneize gentilmente para assegurar a dissolução e homogeneidade. Armazenar de 2-8°C após reconstituição. Alternativamente, os calibradores podem ser fornecidos prontos para uso.
2. Inclua os calibradores (50µL por tubo; tubos em duplicata) e pelo menos um soro controle positivo fornecido com o kit do mesmo modo como as amostras de pacientes no protocolo de ensaio descrito anteriormente para uso sem calibradores (10 tubos adicionais são necessários).
3. Prepare a curva de calibração plotando a média de TSH marcado [125] ligado (contagens em 2 min) vs a concentração de calibrador e leia os valores das amostras de soro a partir da curva de calibração.

Resultados típicos para este ensaio são mostrados na Tabela 1 e estudos em nosso laboratório indicam que amostras de soro com níveis de TRAB maiores que 10 unidades por litro podem ser considerados positivos mas é essencial que cada laboratório estabeleça seus próprios valores de normalidade.

Publicações Úteis

1. Southgate K, Creagh F, Teece M, Kingswood C and Rees Smith B. A receptor assay for the measurement of TSH receptor antibodies in unextracted serum. *Clinical Endocrinology* (1984) 20: 539-543.
2. Rees Smith B, McLachlan SM and Furmaniak J. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocrine Reviews* (1988) 9: 106-121.
3. Bolton J, Sanders J, Oda Y, Chapman C, Konno R, Furmaniak J and Rees Smith B. Measurement of thyroid-stimulation hormone receptor autoantibodies by ELISA. *Clinical Chemistry* (1999) 45: 2285-2287.
4. J. Sanders, Y. Oda, S. Roberts, A. Kiddie, T. Richards, J. Bolton, V. MacGrath, S. Walters, D. Jaskolski, J. Furmaniak and B. Rees Smith. The interaction of TSH receptor autoantibodies with 125 I-labelled TSH receptor. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* (1999) 84: 3797-3802.

Revisão assessoria: 23/05/2006

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828
Registro do Produto M.S.: 10337680031
 CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:
Genese Produtos Diagnósticos Ltda.
 Autorização de Funcionamento M.S.:103376-8
 Rua Diogo Vaz, 291 – CÂMBUCI
 CNPJ. 68.384.155/0001-02
 CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:
RSR Limited
Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987