

# Anti-TG

Teste ELISA para determinação quantitativa de anticorpos de tireoglobulina (Tg) em soro ou plasma humano.

Apenas para uso diagnóstico in vitro.

96 Testes

Código: 67001

## INTRODUÇÃO

Anticorpos anti-tireoglobulina estão caracteristicamente presentes em pacientes com tireoidite e tirotoxicose primária. Esta é a razão pela qual a medição clínica tem se mostrado importante auxílio para diagnóstico de disfunções de tireóide. Medições de anticorpos anti-Tg no passado eram feitas por hemaglutinação passiva (PHA). O teste PHA não possui sensibilidade como o teste imunoenzimático e é limitado pela interpretação subjetiva. O teste ELISA permite detectar anticorpos anti-Tg em níveis sub-clínicos.

## PRINCÍPIO

Neste método, soro referência, amostra diluída do paciente ou controle é adicionado ao poço da microplaca. Tireoglobulina biotinilada é adicionada, e então os reagentes são homogenizados. A reação ocorre entre os auto-anticorpos contra Tg e a tireoglobulina biotinilada, que forma um imunocomplexo que se deposita na superfície da streptavidina que reveste os poços e possui alta afinidade com a biotina. Depois do período de incubação, a aspiração ou decantação separa os reagentes ligados dos não-ligados nos poços. O conjugado enzimático anti-IgG humano é adicionado e interage com o imunocomplexo. O conjugado torna possível a quantificação da reação. Depois da lavagem, a atividade enzimática é determinada pela reação com o substrato, que produz cor. O uso de diversas referências de amostras com valores conhecidos de anti-Tg permite a construção de um gráfico. Através de comparação com a curva dose resposta, é possível determinar a concentração de anti-Tg nas amostras.

## REAGENTES

**1. Microplaca:** 1 microplaca 12X8 poços quebráveis revestidos com Tireoglobulina e embalada em embalagem de alumínio com dessecante. Trazer a temperatura ambiente antes do uso. Re-embale os poços não utilizados na embalagem original e armazene entre 2 a 8 graus C.

**2. Conjugado Enzimático – 1 frasco de 14ml. Pronto para uso.** 1 frasco de anti IgG humano conjugado à HRP em tampão matrix. Contém Thimerosal 0.02% como conservantes. Armazenar entre 2 a 8 graus C.

**3. Diluente de amostra:** 2 frascos com 50ml. Contem estabilizador da proteína PBS/Tween e Thimerosal 0,1% como conservante. Armazenar entre 2 a 8 graus C.

**4. Curva padrão:** 1 frasco de 1 ml de cada padrão. Pronto para uso. 0, 50, 125, 500, 1000 e 2000 IU/ml.

Armazenar entre 2 a 8 graus C. Contém Thimerosal 0.1% e Gentamicin 0.005% como conservantes. Os padrões foram calibrados utilizando como referência soluções com concentrações conhecidas, que foram ensaiadas contra o padrão A65/93 da Medical Research Council (MRC).



**5. Solução de lavagem:** 20x concentrada. 1 frasco com 50ml. Contém tampão fosfatado e detergente (Tween 20). Antes de usar, diluir em 1000 ml de água destilada. Algumas vezes, cristais podem estar presentes quando a solução for armazenada entre 2 a 8 graus C. Estes cristais são dissolvidos quando a solução atingir temperatura ambiente ou quando a solução for dissolvida. Armazenar entre 2 a 30 graus C.

**6. Substrato TMB:** 1 frasco com 15 ml. Contém TMB em tampão citrato. Armazenar entre 2 a 8 graus C. Precaução: armazenar sob proteção da luz. Pronto para uso.

**7. Solução de parada:** 1 frasco com 15 ml. Contém 0.3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Precaução: manusear com cuidado. Pronto para uso.

**9. Seladores de microplaca:** 2 seladores de microplaca para serem utilizados durante os procedimentos de incubação.

## 10. Instruções de uso

### Nota

Todos os produtos que contém soro foram testados e demonstraram ser não reativos para HBsAg, HIV 1 e 2 e HCV por testes aprovados pelo FDA. Entretanto, como nenhum teste oferece segurança completa para agentes infecciosos, estes produtos devem ser manuseados como potencialmente infectantes e capazes de transmitir doenças infecciosas. Boas práticas de laboratório para manuseio de produtos derivados de sangue devem ser utilizadas e podem ser encontradas na publicação: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," 2 Edição, 1988, HHS Publicação No. (CDC) 88-8395.

## ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE DO KIT

1. O kit deve ser armazenado entre 2 a 8 graus C e utilizado até a data de validade impressa no rótulo.
2. O kit fechado é válido até a data de validade impressa no rótulo.
3. Kits abertos são estáveis por sessenta dias quando armazenados entre 2 a 8 graus C.
4. O diluente de amostra concentrado pode apresentar precipitado ou estar turvo quando armazenado entre 2 a 8 graus C. Isto é normal e ocorre devido à alta concentração do reagente. Traga o reagente para temperatura ambiente para os precipitados se solubilizarem antes da diluição. Depois do reagente diluído, a estabilidade do mesmo é de sessenta dias quando armazenado entre 2 a 8 graus C.

## COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Colete a amostra por venipunção em tubo à vácuo siliconizado de 10 ml. As precauções usuais de coleta por venipunção devem ser observadas. Separe as células vermelhas por centrifugação e utilize o soro ou plasma. Amostras podem ser refrigeradas por um período de até 48 horas. Se a amostra não puder ser testada neste período, o congelamento a -20 graus C é recomendado por até 30 dias. Para ensaios em duplicata, é necessário 0,1 ml de amostra.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

1. Pipeta de 10 e 50µl, com precisão melhor que 1,5%.
2. Pipeta para dispensações repetidas de 0.100ml, 0.300 ml e 1ml com precisão melhor que 1,5%.
3. Lavadora de microplaca ou garrafa squeeze (opcional)
4. Leitora de microplaca com filtros de 450 e 620nm.
5. Papel absorvente
6. Aspirador a vácuo (opcional)
7. Cronômetro

## PREPARO DOS REAGENTES

**Solução de lavagem –** Diluir o conteúdo da solução de lavagem concentrada em 1000 ml de água destilada ou deionizada. A solução reconstituída é estável por 1 semana quando armazenada em temperatura ambiente e por 2 a 3 semanas quando armazenada entre 2 a 8 graus C.

### Diluição de amostra (1/100)

Dispense 0.010ml (10µl) de cada amostra de paciente em 1 ml de diluente de amostra. Cubra e misture utilizando um vortex ou por inversão. A amostra diluída pode ser armazenada entre 2 a 8 graus C por até 48 horas.

## PROCEDIMENTO DO TESTE

Antes do início do ensaio, traga todos os reagentes para temperatura ambiente (20 a 30 graus C).

1. Formate os poços da microplaca para cada soro referência, controles e amostras dos pacientes em duplicata. Guarde os poços não utilizados na embalagem de alumínio original, sele e armazene entre 4 a 8 graus C.

2. Pipetar 50 µl do soro referência e amostras dos pacientes diluídas nos poços adequados.

3. Incubar 60 minutos em temperatura ambiente.

4. Descarte o conteúdo dos poços por decantação ou aspiração. Se for utilizar o procedimento de decantação, utilize papel absorvente.

5. Adicione 300 ul de solução de lavagem reconstituída, decante ou aspire. Repita este procedimento 2 vezes para um total de 3 lavagens. Lavadora manual ou automática pode ser utilizada. Se for utilizar uma garrafa squeeze, preencha cada poço evitando a formação de bolhas. Decante a solução de lavagem e utilize papel absorvente.

6. Adicione 100 ul de conjugado enzimático em cada poço. Sempre adicione os reagentes na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre os poços.

7. Agite a microplaca gentilmente, cubra com selador e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.

8. Descarte o conteúdo dos poços por decantação ou aspiração. Se for utilizar o procedimento de decantação, utilize papel absorvente.

9. Adicione 300 ul de solução de lavagem reconstituída, decante ou aspire. Repita este procedimento 2 vezes para um total de 3 lavagens. Lavadora manual ou automática pode ser utilizada. Se for utilizar uma garrafa squeeze, preencha cada poço evitando a formação de bolhas. Decante a solução de lavagem e utilize papel absorvente.

10. Adicione 100 ul de substrato TMB em cada poço.

11. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.

12. Adicione 100 ul de solução de parada e misture gentilmente por 15 a 20 segundos.

13. Realize a leitura das absorbâncias a 450nm com uma leitora de ELISA. Os resultados podem ser lidos em até 30 minutos após o término da reação.

Nota: para amostras re-ensaiadas com concentrações superiores a 2000IU/ml, dilua a amostra adicionalmente 1:10 ou 1:50 utilizando diluente de amostra. Multiplique o fator de diluição para obter a concentração da amostra.

## CONTROLE DE QUALIDADE

Cada laboratório deve estabelecer intervalos de referência e monitorar o desempenho dos ensaios. Os controles devem ser tratados como amostras desconhecidas e os valores devem ser determinados em cada ensaio. O controle de qualidade deve ser feito a fim de observar o desempenho do ensaio e reagentes. Métodos estatísticos pertinentes devem ser empregados. Cada laboratório deve estabelecer limites de aceitação.

Outros parâmetros que devem ser monitorados incluem 80,50 e 20% de interceptação na curva padrão para reprodutibilidade. Os valores de absorção devem ser coerentes com experiências passadas. Desvios significativos podem indicar mudanças nas condições do ensaio ou degradação dos reagentes. Um novo kit deve ser utilizado para determinar a razão das variações.

## RESULTADOS

Uma curva referência é utilizada para determinar a concentração de amostras com valores desconhecidos.

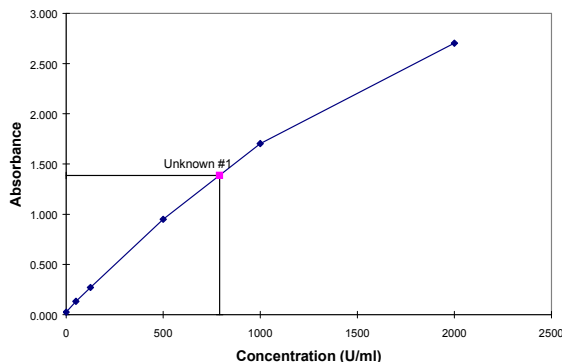
1. Imprima a absorbância obtida.
2. Plote os valores de absorbância de cada duplicata contra a atividade de anti-Tg em IU/ml em um papel gráfico linear.
3. Desenhe a melhor curva com os pontos obtidos.
4. Para determinar a concentração de anti-TG de amostras desconhecidas, localize na curva a absorbância da duplicata e realize a intersecção para determinar a concentração. No

exemplo abaixo a absorbância 1,387 determina concentração de 790 IU/ml de anti-Tg.

Poço	Calibrador	Absorbância		
1	0 IU/ml	0.022		
2	0 IU/ml	0.028		
3	50 IU/ml	0.135		
4	50 IU/ml	0.131		
5	125 IU/ml	0.280		
6	125 IU/ml	0.261		
7	500 IU/ml	0.962		
8	500 IU/ml	0.936		
9	1000 IU/ml	1.709		
10	1000 IU/ml	1.698		
11	2000 IU/ml	2.739		
12	2000 IU/ml	2.667		
	desconhecido	Avg.		
Poço	I. D.	O.D.	O.D.	Valor
13	Desconhecido #11.390			
14	Desconhecido #11.383		1.387	790 IU/ml

Os valores apresentados no exemplo 1 e figura 1 são apenas ilustrativos, e não devem ser utilizados como curva padrão para os ensaios.

Figura 1



#### PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Absorbância calibrador 2000 IU/ml = 1.5 – 3.5

Absorbância calibrador 0.0 IU/ml = < 0.100

O range entre a principal absorbância de cada calibrador deve ser > 1.20

#### LIMITAÇÕES DO ENSAIO

**Desempenho do ensaio.** É importante que o tempo de reação de cada poço seja constante a fim de obter resultados reproduzíveis. A pipetagem não deve ultrapassar 10 minutos. Se duas placas forem utilizadas, é importante a elaboração de duas curvas. A adição de substrato inicia uma reação cinética, que termina após a adição da solução de parada. Por isso, a adição do substrato e da solução de parada devem se dar na mesma sequência para eliminar qualquer desvio na reação. Leitoras de placa realizam a medição verticalmente. Não toque no fundo dos poços da microplaca. A falha nos procedimentos de decantação ou aspiração podem ocasionar não reprodutibilidade dos resultados. Concentrações excessivamente altas de anti-Tg podem contaminar amostras imediatamente ao lado. Duplicata ruim é indicativo de contaminação cruzada. Repita os ensaios das amostras que forem

testadas ao lado de amostras com altas concentrações. Amostras contaminadas microbiologicamente não devem ser utilizadas.

**Interpretação:** se um computador é utilizado para a interpretação dos resultados, os valores preditivos dos controles não devem cair mais que 10% das concentrações determinadas. A presença de auto-anticorpos contra Tg é confirmada quando os níveis na amostra excedem 125 IU/ml. O significado clínico do resultado, combinado com a atividade da anti-tireoperoxidase pode ser usado para avaliar as condições da tireóide. Todavia, um diagnóstico definitivo não deve ser dado com base apenas nos resultados destes testes, e sim com base em todas as manifestações clínicas e resultados de outros testes, combinados com estes.

#### VALOR ESPERADO

O estudo de uma população normal foi feito para determinar valores esperados para o ensaio de anti-Tg.

O número (n), média (x) e padrões de variação são demonstrados na tabela 1. Valores maiores que 125 IU/ml são considerados positivos para a presença de anticorpos anti-Tg.

Tabela 1

#### Valores esperados para anti-Tg ELISA (em IU/ml)

Número (n)	100
Média (X)	74.3
PAdrão de variação (σ)	25.2
Nível upper 95% (+2σ)	124.7

É importante ter em mente que estabelecer um valor de referência de valores que devem ser esperados para uma população normal depende de uma série de fatores: especificidade do método, população testada, precisão do método e mão do analista. Por estas razões cada laboratório deve estabelecer seu próprio valor de referência.

#### CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

##### Precisão

A precisão intra e entre ensaio foi determinada pela análise em 3 diferentes níveis de pool de soro. Os números, valores médios, padrão de variação para cada soro controle estão demonstrados nas tabelas 2 e 3.

TABELA 2 – Precisão intra-ensaio (Valores em IU/ml)

Amostra	N	X	S.D.	C.V.
Pool 1	31	0.14	0.01	3.7%
Pool 2	31	1.16	0.03	2.6%
Pool 3	31	2.46	0.07	2.8%

TABELA 3 – Precisão entre-ensaio (Valores em IU/ml)

Amostra	N	X	S.D.	C.V.
Pool 1	6	0.15	0.01	5.5%
Pool 2	6	1.08	0.04	4.2%
Pool 3	6	2.39	0.06	2.5%

\*Medidas de 6 experimentos em duplicata.

##### Precisão

O teste foi comparado com outro da mesma metodologia. Amostras biológicas de pessoas normais e populações doentes foram utilizadas. Estas doenças incluem: tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, nódulos na tireóide e carcinoma na tireóide. O número total de amostras é 82. A equação de regressão e correlação de coeficiente foi comparada para o kit em comparação ao outro. Os resultados obtidos são demonstrados na tabela 4.

TABELA 4

Método	Média (x)	Regressão Análise	Correlação Coeficiente
Este método	415.6	y = 9.79 + 0.969 (x)	0.995
Referência	419.2		

Os resultados dos testes demonstraram excelente concordância entre os métodos.

**Sensibilidade.** O kit possui sensibilidade de 5IU/ml.

**Especificidade.** Interferências de ANA, DNA, tireoperoxidase (TPO) e fatores reumatóides demonstraram ser insignificantes.

#### REFERÊNCIAS

1. Volpé R., Autoimmune disease of the endocrine system, Boca Raton FL.: CRC Press, 1990
2. Volpé, R., Clin. Chem., 40, 2132 (1994)
3. Beever K., et. al., Clin. Chem., 35, 1949-54 (1989)
4. Mak T., Clin. Chem., 40, 2128 (1994)

#### GUIA DE SÍMBOLOS



Risco biológico



Limitação de temperatura



Use por

IVD Diagnóstico in vitro

Produzido por: EQUIPAR srl

Via G.Ferrari 21/N – 21047 Saronno (Va) Italy –

Tel. +39-029605422, +39-029605824 –

Fax +39-029607106 –

http://www.equipar.it e-mail: [info@equipar.it](mailto:info@equipar.it)

Importado por: Anfla Produtos para Diagnóstico Laboratorial Ltda

CNPJ: 05.774.798/0001-42

Téc. Resp. Dra. Flávia Lorusso de Oliveira Potye – CRF SP: 35416

Distribuído por: RZ DE OLIVEIRA DIAGNÓSTICA - EPP

Rua Campevas, 627

CEP.05016-010 - São Paulo - SP

CNPJ 05.328.040/0001-80

Téc. Resp. Dra. Renata Zuculin de Oliveira - CRF-SP 37986

Para uso exclusivo diagnóstico "in vitro"

Reg. ANVISA 80189860166

POTENCIALMENTE INFECTANTE

CONSERVAR A TEMPERATURA 2°C A 8°C

PARA DESCARTE, CONSULTAR INSTRUÇÕES DE USO

SERVIÇO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE:

Quaisquer dúvidas técnicas no manuseio deste kit ou no seu

procedimento, contatar a contatar a nossa ASSESSORIA CIENTÍFICA.

Atendimento ao consumidor - Fone (011)-3871-0095

