

# Anti-TPO

Teste Imunoenzimático para determinação quantitativa de anticorpos contra tireoperoxidase em soro ou plasma humano  
Somente para uso diagnóstico in vitro

96 Testes

Código: 68001

## INTRODUÇÃO

Anticorpos contra tireoperoxidase têm se mostrado caracteristicamente presentes em pacientes com tireoidite de Hashimoto (95%), miopatia idiopática (90%) e doença de Graves (80%). De fato, 72% dos pacientes anti-TPO positivos exibem algum grau de disfunção da tireóide. Este teste tem sido ferramenta importante para diagnóstico de disfunções de tireóide. As medições de anti-TPO no passado eram feitas por hemaglutinação passiva (PHA), porém, este teste não possui a sensibilidade do ensaio e é limitado pela interpretação subjetiva. Este procedimento imunoenzimático possui alta sensibilidade e permite a detecção de anticorpos anti-tireoperoxidase em níveis sub-clínicos.

## PRINCÍPIO

Neste método, soro referência e amostra do paciente diluída são primeiramente adicionados aos poços da microplaca. Então, tireoperoxidase biotinizada é adicionada quando os reagentes são misturados. A reação ocorre entre o TPO biotinizado e os anticorpos anti-TPO, que formam um imunocomplexo depositado no fundo dos poços na estreptavidina que os revestem. Depois do período de incubação, aspiração ou decantação separa as substâncias não ligadas ao fundo dos poços. Um conjugado enzimático anti-IgG humano é adicionado para a quantificação do material ligado. Depois da lavagem, a atividade enzimática é determinada pela reação do substrato que produz cor. Através do uso de diversos soros referência, uma curva é gerada e então a concentração de amostras desconhecidas pode ser determinada.

## REAGENTES

**1. Microplaca** 1 microplaca 12X8 poços revestidos com TPO embalada em embalagem aluminizada com dessecante. Trazer à temperatura ambiente antes do uso. Re-sele os poços não utilizados na embalagem original com dessecante e armazene entre 2 a 8 graus C.

**2. Conjugado Enzimático – 1 frasco de 12ml. Pronto para uso.** 1 frasco de anti IgG humano conjugado à HRP em tampão matrix. Contém Thimerosal 0.05% 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:** 6 frascos com 2 ml cada cm os seguintes níveis de anti-TPO: 0, 30, 75, 200, 600 e 1200 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 o padrão internacional 66/287 da Medical Research Council (MRC).



**6. Solução de lavagem:** 1 frasco com 50 ml de solução concentrada 20X. Um frasco contém tampão fosfatado e detergente (Tween 20). Antes de usar, diluir em 1000 ml de água destilada. Algumas vezes, cristais podem estar presentes, porém, estes são re-dissolvidos quando a solução atinge temperatura ambiente ou é diluída. Armazenar entre 2 a 8 graus C.

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

**8. 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 para serem utilizados para proteger os poços durante as incubações.

## 10. Instruções de uso

**Nota:** Todos os reagentes que contêm soro humano foram testados por produtos aprovados pelo FDA e determinados não reativos para HBsAg, HIV 1 e 2 e HCV. Uma vez que nenhum produto é capaz de oferecer completa segurança, os reagentes devem ser tratados como potencialmente infectantes e capazes de transmitir doenças infecciosas. Boas práticas de laboratório podem ser consultadas na publicação: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories," segunda edição, 1988, HHS Publicação No. (CDC) 88-8395.

## CIRCUNSTÂNCIAS E OBSERVAÇÕES

1. Todos os reagentes contidos no kit são para somente o uso de diagnóstico in vitro.
2. Não use o kit ou os reagentes após a data de expiração indica nas etiquetas. Não misture reagentes de lotes diferentes.
3. o procedimento deve ser executado com cuidado, a fim obter resultados de confiança e interpretações clínicas.
4. Tragam todos os reagentes à temperatura ambiente pelo menos 60 minutos antes do uso
5. Evite contaminar reagentes ao retirá-los do frasco. Nós recomendamos usar pipetas automáticas com pontas descartáveis. Ao dispensar reagentes, não toque com a parede das pontas dos poços a fim evitar a contaminação.
6. Para a etapa de lavagem, use somente a solução de lavagem fornecida no kit e siga com cuidado as indicações relatadas no procedimento. Recomenda-se de qualquer maneira usar uma lavadora de microplacas de boa qualidade.
7. As amostras e os materiais potencialmente contaminados têm que ser segurados com cuidado porque podem transmitir a infecção. Todos os objetos que vêm no contato direto com amostras e todos os resíduos do ensaio devem ser tratados ou eliminados como potencialmente contaminados. Os melhores procedimentos para a inativação são tratamentos com a autoclave em 121 C por 30 minutos ou com hipoclorito de sódio com uma concentração final de 2.5% por 24 horas. Este último método pode ser usado tratando as lavagens líquidas que têm que ser neutralizadas antes com hidróxido de sódio.
8. Evite todo o contato com pele e mucosas, especialmente com o reagente de parada.
9. Em todo caso, use luvas protetoras para manusear os reagentes.

## ARMAZENAGEM E ESTABILIDADE

1. O kit deve ser armazenado entre 2 a 8 graus C e deve ser utilizado até a data de validade impressa no rótulo.
2. O kit fechado é válido até a data de validade impressa no rótulo.
3. Reagentes abertos são estáveis por até sessenta dias quando armazenados entre 2 a 8 graus C.
4. O diluente de amostra concentrado pode apresentar-se turvo ou com precipitado. Estas condições são normais uma vez que o reagente é altamente concentrado. Antes de diluir o reagente, trazer o mesmo à temperatura ambiente e solubilizar todo precipitado. A solução diluída é estável por 60 dias quando armazenada entre 2 a 8 graus C.

## COLETA E PREPARO DAS AMOSTRAS

Colete as amostras por venipunção em tubo de 10 ml siliconizado a vácuo. As precauções usuais de coletas por venipunção devem ser observadas. Separe as células vermelhas por centrifugação e utilize o soro ou plasma para o ensaio. Amostras podem ser refrigeradas por até 48 horas. Se a amostra não for testada neste período, ela pode ser

congelada a -20 graus C por até 30 dias. Para ensaios em duplicata, 0,05 ml de amostra diluída é necessário.

## MATERIAS NECESÁRIOS E NÃO FORNECIDOS

1. Pipetas de 10 e 100 ul com precisão melhor que 1,5%.
2. Pipetas para dispensações repetidas de 0,100 ml, 0,300 ml e 1 ml com precisão melhor que 1,5%.
3. Lavadora de microplaca ou garrafa squeeze (opcional).
4. Espectrofotômetro com filtros de 450 nm e 620 nm.
5. Papel absorvente.
6. Aspirador à vácuo (opcional).
7. Cronômetro.

## PREPARO DOS REAGENTES

### 1. Diluente de amostra

Diluir o diluente de amostra concentrado em 200 ml de água destilada ou deionizada. Armazenar em recipiente adequado entre 2 a 8 graus C.

**2. Solução de lavagem –** Diluir o conteúdo da solução de lavagem concentrada em 1000 ml de água destilada ou deionizada. Armazenar em temperatura ambiente por até uma semana ou entre 2 a 8 graus C por até 3 semanas em recipiente adequado.

### 3. Diluição das amostras (1/100)

Dispensar 0.010ml (10µl) de amostra de cada paciente em 1 ml de diluente de amostra. Cobrir e misturar por vortex ou inversão da solução. As amostras diluídas podem ser armazenadas entre 2 a 8 graus C por até 48 horas.

## PROCEDIMENTO DO TESTE

Antes de iniciar o 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. Re-embaie os poços não utilizados na embalagem original e armazene-os entre 2 a 8 graus C.
2. Pipetar 100 ul dos soros referência, controles e amostras previamente diluídas nos poços adequados.
3. Misturar o conteúdo dos poços gentilmente por 20 a 30 segundos e cobrir.
4. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente.
5. Descartar o conteúdo dos poços por decantação ou aspiração. Em caso de decantação, bata a placa contra papel absorvente.
6. Adicionar 300 ul de solução de lavagem previamente preparada decante ou aspire. Repetir o procedimento de lavagem mais duas vezes para um total de 5 lavagens. Se utilizar garrafa squeeze, evite a formação de bolhas. Decante ou aspire o conteúdo dos poços.
7. Adicione 100 ul de conjugado enzimático aos poços. Sempre pipete os reagentes na mesma ordem a fim de obter tempos de reação iguais entre os poços.
8. Misture o conteúdo dos poços gentilmente, cubra a microplaca e incube por 30 minutos a temperatura ambiente.
9. Descartar o conteúdo dos poços por decantação ou aspiração. Em caso de decantação, bata a placa contra papel absorvente.
10. Adicionar 300 ul de solução de lavagem previamente preparada decante ou aspire. Repetir o procedimento de lavagem mais duas vezes para um total de 5 lavagens. Se utilizar garrafa squeeze, evite a formação de bolhas. Decante ou aspire o conteúdo dos poços.
11. Adicione 100ul de solução TMB aos poços.
12. Incube por 15 minutos a temperatura ambiente.
13. Adicione 100 ul de solução de parada.
14. Leia a absorbância de cada poço a 450 nm com o uso de um espectrofotômetro. A leitura pode ser realizada em até 30 minutos após o término do ensaio. Para amostras com concentração superior a 500 IU/ml, dilua a amostra adicionalmente 1:10 ou 1:100. Multiplique o fator de diluição para obter a concentração da amostra.

## CONTROLE DE QUALIDADE

Cada laboratório deve ensaiar e estabelecer valores de referência para relevâncias clínicas e controles para monitorar o desempenho dos testes. Estes controles devem ser tratados como amostras desconhecidas e os valores devem ser estabelecidos em todos os ensaios. Métodos estatísticos pertinentes devem ser empregados. Máximas absorvâncias obtidas no passado devem ser utilizadas como referência para ensaios no momento. Desvios significativos podem indicar alguma alteração no desempenho dos reagentes, e um novo kit deve ser testado.

## RESULTADOS

Uma curva referência é obtida com os padrões, a fim de estabelecer a concentração nas amostras desconhecidas.

1. Imprima as absorvâncias obtidas.

2. Plote os valores das duplicatas de cada soro referência em papel gráfico (atividade de anti-TPO X ABS).

3. Desenhe a melhor curva com os pontos obtidos.

4. Para determinação da concentração de anti-TPO das amostras obtidas, localize o valor da ABS em um eixo e cruze-o no outro para a obtenção do valor

No exemplo abaixo a absorvância 1,15 cruza o eixo horizontal em 200IU/ml.

### EXEMPLO 1

Poço	Calibrador	Absorvância
1	0 IU/ml	0.114
2	0 IU/ml	0.114
3	30 IU/ml	0.376
4	30 IU/ml	0.376
5	75 IU/ml	0.673
6	75 IU/ml	0.676
7	200 IU/ml	1.202
8	200 IU/ml	1.294
9	600 IU/ml	1.790
10	600 IU/ml	1.801
11	1200 IU/ml	2.006
12	1200 IU/ml	1.937

Desconhecido	Avg.	Valor
Poço	I. D.	O.D.
13	Desconhecido #11.642	
14	Desconhecido #11.620	1.631 408.31 IU/ml

\*Os valores demonstrados no exemplo 1 e figura 1 são apenas demonstrativos e não devem ser utilizados como curva padrão nos ensaios.

## PARÂMETROS DE CONTROLE DE QUALIDADE

Absorvância (500 IU/ml - calibrador) = 1.5 – 3.5

Absorvância (0.0 IU/ml - calibrador) < 0.100

A variação da média das absorvâncias de cada calibrador deve ser > 1.20

## LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

**Desempenho do ensaio.** É importante que o tempo de reação entre os poços seja constante a fim de se obter resultados reproduzíveis. A pipetagem das amostras não deve levar mais que 10 minutos. Se mais de uma placa for utilizada, é recomendado repetir a curva. A adição de substrato inicia uma reação cinética, que é finalizada pela adição da solução de parada. Por isso, a adição de substrato e solução de parada deve ser feita na mesma ordem para eliminar variações. Leitoras de placa realizam leitura verticalmente. Não tocar no fundo dos poços da microplaca. Falhas nos procedimentos de pipetagem e lavagem podem

ocasionar resultados errôneos. Altas concentrações de anti-TPO em amostras podem contaminar as amostras que estão sendo testadas imediatamente ao lado. É recomendado o re-teste destas. Duplicata ruim é indicativo de contaminação. Repetir o ensaio e amostras com ABS superior a 3,0. Amostras contaminadas biologicamente não devem ser utilizadas.

**Interpretação.** Se um computador é utilizado para interpretação dos resultados, os valores preditivos dos calibradores podem cair 10% dos valores de concentração. A presença de anticorpos anti-TPO é confirmada quando os níveis na amostra excedem 40IU/ml. O significado clínico do resultado, combinado com o resultado de anti-TG, deve ser avaliado em conjunto para determinação das condições de funcionamento da tireóide. O diagnóstico final deve ser dado por um médico, baseado nos resultados dos testes e manifestações clínicas do paciente.

## VALORES ESPERADOS

Um estudo de uma população normal foi feito para determinação de níveis adequados para anti-TPO. O número (n) média (x) e padrões de variação são demonstrados na tabela 1. Valores que excedem 40IU/ml são considerados positivos para presença de anticorpos anti-TPO.

### TABELA 1

Valores esperados para Anti-TPO – ELISA (em IU/ml)	
Número (n)	100
Média (X)	17.6
Padrão de variação ( $\sigma$ )	10.8
Upper 95% (+2 $\sigma$ ) nível	39.2

É importante ter em mente que estabelecer um valor normal para uma população implica na observação de múltiplos fatores: especificidade do método, população testada, precisão do método e mãos do analista. Por estas razões cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de referência.

## CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

**Precisão** A precisão intra e entre ensaio foi determinada através da análise de 3 níveis de concentrações. Os números, médias, desvio padrão e coeficiente de variação são demonstrados nas tabelas 2 e 3.

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

Amostra	N	X	S.D.	C.V.
Pool 1	20	25.5	1.5	5.7%
Pool 2	20	120.5	4.6	3.8%
Pool 3	20	352.4	14.8	4.2%

### TABELA 3\* - Precisão entre-ensaio (Valores em IU/ml)

Amostra	N	X	S.D.	C.V.
Pool 1	10	26.5	1.8	6.8%
Pool 2	10	118.5	5.3	4.5%
Pool 3	10	365.4	22.5	6.2%

\*Medições em 10 experimentos em duplicata.

**Exatidão** O kit foi comparado a outro com amostras biológicas normais e de pacientes doentes. As doenças incluem: tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, nódulos na tireóide e carcinoma de tireóide. O número total de amostras foi 82. Os resultados são demonstrados na tabela 4.

### TABELA 4

Método	Média (x)	Análise de regressão	Coefficiente de correlação
Este método	122.9	y = 1.02 (x) – 5.1	0.989

Referência	127.0	
------------	-------	--

**Sensibilidade.** O kit possui sensibilidade de 1.5 IU/ml.

**Especificidade.** Interferências de ANA, DNA, Tg e fatores reumatóides foram 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. **Burek, CL, Rose, NR**, Human Pathol. 17, 246-53 (1986).

## GUIA DE SÍMBOLOS



Risco biológico



Limitação de temperatura



Usar 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 80189860173

## 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

