

## INSTRUÇÕES DE USO - TSH

### Teste de ELISA colorimétrico para detecção de TSH no soro – HST367

Teste ELISA para a determinação de TSH (Tirotropina) no soro.

Teste para 96 determinações

#### SUMÁRIO

O Hormônio estimulante da tireóide ou Tirotropina (TSH) é secretado pela adenohipófise, em função das concentrações dos hormônios tireoidianos T3 e T4 e do estímulo pelo Hormônio liberador de tireotropina (TRH) secretado pelo hipotálamo (eixo hipotálamo-hipófise-tireóide). Consiste em uma glicoproteína de 28 kDa, composta por 2 subunidades polipeptídicas, sendo a subunidade  $\alpha$  geralmente compartilhada por outros hormônios glicoproteicos como FSH, LH e hCG, enquanto a subunidade  $\beta$  é específica do TSH. Sua liberação obedece a um ciclo circadiano, tendo variações na concentração durante um período de 24 horas.

A determinação do TSH, associada a análise de T3 e T4, permite uma avaliação sensível da função tireoidiana, especialmente para confirmar o diagnóstico de hipotireoidismo ou de hipertireoidismo. No hipotireoidismo primário, o funcionamento deficiente da tireóide leva a uma secreção diminuída de hormônios tireoidianos e a um aumento por feedback da produção de TSH na tentativa de estimular a tireóide. Deficiências na hipófise (hipotireoidismo secundário) ou na estimulação pelo TRH (hipotireoidismo terciário) implicam em um nível baixo de TSH, que por sua vez leva a concentrações diminuídas dos hormônios tireoidianos (como T4). Por outro lado, hormônios da tireóide com concentrações aumentadas associadas a níveis reduzidos de TSH caracterizam o hipertireoidismo.

A metodologia de imunoenensaio enzimático (ELISA) fornece ótima sensibilidade e requer poucas manipulações, em uma determinação direta da concentração de TSH.

#### PRINCÍPIO

Neste método, os soros-padrão e as amostras de soro em análise são adicionados aos respectivos pocinhos da microplaca, que foram previamente recobertos com streptoavidina. Anticorpos policlonais anti-TSH conjugados à peroxidase e anticorpos monoclonais anti-TSH conjugados à biotina são adicionados e os reagentes são misturados. Os anticorpos reconhecem o TSH existente, formando complexos que se ligam às moléculas de streptoavidina imobilizadas na placa. Após a etapa de incubação, o excesso de reagentes não imobilizados é eliminado na lavagem, e o substrato enzimático é adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul, que é transformada em amarela com a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é diretamente proporcional à quantidade de tirotropina existente. Através da construção da curva-padrão, é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio nas amostras.

**Tempo total de incubação:** 1 hora e 15 minutos.

## COMPONENTES DO KIT

- ◆ Material suficiente para 96 determinações
- 1. **MICROPLACA:** 12 tiras de 8 pocinhos cada, marcados com streptoavidina, dispostas em suporte  
**Pronta para uso**
- 2. **PADRÕES DA CURVA:** soro humano diluído em tampão com conservante, contendo TSH nas concentrações:  
PADRÃO A: 0 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO B: 0,5 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO C: 2,5 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO D: 5,0 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO E: 10,0 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO F: 20,0 µUI/mL, 0,5 mL  
PADRÃO G: 40,0 µUI/mL, 0,5 mL  
**Prontos para uso**
- 3. **CONJUGADO:** 13 mL, anticorpos policlonais anti-TSH conjugados à peroxidase, anticorpos monoclonais anti-TSH conjugados à biotina, em solução tampão com estabilizantes, conservantes e corante  
**Pronto para o uso**
- 4. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM:** 20 mL, solução tampão com conservantes  
**Concentrada 50x**
- 5. **SUBSTRATO:** 12 mL, 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB) em solução tampão contendo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
**Pronto para uso**
- 6. **SOLUÇÃO DE PARADA:** 8 mL, ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,5 M  
**Pronta para uso**
- 7. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades
- 8. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

## ARMAZENAMENTO

- Armazenar o kit entre +2 e +8° C.
- As tiras da microplaca não utilizadas devem ser protegidas da umidade, mantidas na embalagem original selada, com o dessecante.
- Os reagentes são estáveis até o prazo de validade do kit, se conservados adequadamente.
- Depois de abertos, todos os componentes do kit são estáveis por 60 dias, se conservados entre +2 e +8° C.
- Não expor os reagentes à luz solar ou luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o substrato sempre ao abrigo da luz.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO INCLuíDOS NO KIT

- Água deionizada
- Micropipetas e ponteiras descartáveis
- Agitador tipo vórtex
- Papel absorvente
- Cronômetro
- Sistema de lavagem manual ou automático com capacidade para 300 µL
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, 620-630 nm

## PRECAUÇÕES DE USO

Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*

### MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, bem como para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estão sendo manuseados.
- Evitar o contato do substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas, usando recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.

### COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- É aconselhável usar amostras colhidas em jejum matutino, para termos de comparação com os valores normais estabelecidos.
- Coletar as amostras de sangue sem aditivos ou barreira de gel. Após a coagulação, processá-las imediatamente para obtenção de soros sem hemólise.
- Evitar o uso de soros hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8° C por no máximo 5 dias, ou congeladas a -20° C por até 30 dias. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez.

## PROCEDIMENTO

### Operações prévias

1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit, controles e amostras à temperatura ambiente (+20 a +27° C), e homogeneizar suavemente.
2. **Solução de lavagem diluída:** diluir 1 parte da solução concentrada (50x) para 49 partes (1:50) de água deionizada (exemplo: 10 mL + 490 mL), e estocar em frasco adequado. A solução concentrada permite a preparação de um volume total de 1000 mL (1 litro) de *solução de lavagem diluída*. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C. Armazenar a solução diluída entre +2 e +8° C.
3. Deixar que a microplaca atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, retornando as restantes para a embalagem com dessecante e selando. Reservar dois pocinhos (duplicatas) para cada padrão, controles internos do laboratório e amostras.  
Exemplo: pocinhos A1 e A2 para o *padrão A*, B1 e B2 para o *padrão B*, C1 e C2 para o *padrão C*, D1 e D2 para o *padrão D*, E1 e E2 para o *padrão E*, F1 e F2 para o *padrão F*, G1 e G2 para o *padrão G*, H1 e H2 para o *controle "X"*, etc.

### Realização do teste

1. Dispensar 50 µL dos padrões, controles internos do laboratório e amostras nos respectivos pocinhos (em duplicata).
2. Adicionar 100 µL dos anticorpos conjugados a cada pocinho.
3. Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos, para homogeneizar. Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora à temperatura ambiente (+20 a +27° C).
4. Descartar o conteúdo de todos os pocinhos por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL da solução de lavagem diluída, aspirar ou decantar, e repetir o processo mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante, batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
5. Dispensar 100 µL do substrato em cada pocinho. Dispensar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar os efeitos de tempo de reação entre os poços.
6. Cobrir novamente com a folha adesiva e incubar por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
7. Adicionar 50 µL da solução de parada a cada pocinho, na mesma ordem usada anteriormente. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos, para homogeneizar.
8. Ler a absorbância a 450 nm, dentro de máximo 30 minutos. Usar a absorbância de 620-630 nm para minimizar as imperfeições da placa.

### Nota

Para repetir o teste de amostras com concentração abaixo de 0,5 µUI/mL:

1. Eliminar o padrão G (40,0 µUI/mL).
2. Incubar as amostras com os conjugados por 2 horas, à temperatura ambiente.
3. Proceder ao restante do ensaio como descrito.

## CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta usando os padrões fornecidos no kit (**curva-padrão**), é possível calcular a concentração de tirotropina nas amostras testadas. Isso pode ser feito com auxílio de qualquer programa de computador que faça gráficos, ou à mão, em papel milimetrado.

1. Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada pocinho correspondente aos padrões, controles ou amostras. Calcular a **absorbância média** das duplicatas:  $(Abs_1 + Abs_2) / 2$ .
2. Para construir a **curva-padrão**, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos padrões, não o valor médio das duplicatas. Plotar em um gráfico a **absorbância** das duplicatas dos padrões (eixo Y vertical) em função da **concentração** de tirotropina em  $\mu\text{UI/mL}$  correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a **curva-padrão**.
3. Determinar a concentração de TSH (em  $\mu\text{UI/mL}$ ) para cada controle ou amostra, projetando a **absorbância média** das duplicatas sobre a curva-padrão.

#### CONTROLE DE QUALIDADE

- A cada ensaio, é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo. Para monitorar a performance do teste, é aconselhável incluir controles internos correspondentes aos valores limites de hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter registros de Controle de Qualidade, para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou degradação dos reagentes do kit. Reagentes frescos devem ser usados para determinar a razão das variações.

#### LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

##### Performance do ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas. As soluções do kit devem estar límpidas, livres de contaminação microbiológica, e dentro do prazo de validade. Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções dadas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações. A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder 10 min, e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma sequência. Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.

- A leitora de microplacas mede a absorbância na vertical. Evitar tocar o fundo dos pocinhos.
- Em caso de dúvidas, contatar o Serviço de Atendimento ao Cliente, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

#### Interpretação

- O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- A concentração sérica de tirotrópina depende de vários fatores, tais como o funcionamento do hipotálamo, o funcionamento da tireóide e o nível de resposta da hipófise ao TRH. Portanto, a concentração de TSH não é suficiente para determinar o estado clínico.
- Drogas tais como domperidone, amiodazone, iodeto, fenobarbital e fenitoína podem elevar a concentração de TSH. Por outro lado, a administração de propanolol, metimazol, dopamina e d-tiroxina pode diminuir o nível sérico de TSH.
- Variações genéticas ou a degradação da tirotrópina em subunidades podem afetar a capacidade de ligação dos anticorpos, influenciando no resultado do ensaio. Tais amostras apresentam comportamentos diferentes em diversos tipos de testes, devido à reatividade dos anticorpos presentes em cada um deles.
- Este teste não é adequado para a avaliação em recém-nascidos.

#### VALORES ESPERADOS

- Para determinar os valores esperados neste teste por ELISA para Tirotrópina, foi realizado um estudo em uma população adulta eutiróide (N = 139), utilizando uma análise estatística não-paramétrica (percentil estimado de 95%). Os valores esperados são apresentados na Tabela 1.

**TABELA 1 - Valores esperados para ELISA para Tirotrópina (em  $\mu\text{UI/mL}$ )**

Valor normal baixo	0,39
Valor normal alto	6,16
Intervalo de confiança de 70% para percentil de 2,5	
Faixa de valores baixos	0,28 – 0,53
Faixa de valores altos	5,60 – 6,82

- É importante ressaltar que o estabelecimento de uma faixa de valores esperados para uma população, usando um determinado método, depende de vários fatores, tais como a especificidade do método, a população testada e a precisão na execução do método. Por estas razões, cada laboratório deve tentar estabelecer sua própria faixa de valores esperados usando a população em estudo.

#### PERFORMANCE

##### Precisão

Para determinar a precisão intra-análise e inter-análise, foram testados *pools* de soros-controle com diferentes níveis de TSH. O número de amostras (N), valores médios (X), desvio-padrão (dp) e coeficiente de variação (cv) para cada controle estão representados nas Tabelas 2 e 3.

**TABELA 2 - Precisão Intra-análise (em  $\mu\text{UI/mL}$ )**

Amostra	N	X	dp	cv
Pool 1	24	1,69	0,07	4,1%
Pool 2	24	13,75	0,54	4,0%
Pool 3	24	39,40	1,95	4,9%

**TABELA 3 - Precisão Inter-análise (em  $\mu\text{UI/mL}$ )**

Amostra	N	X	dp	cv
Pool 1	10	1,78	0,11	5,9%
Pool 2	10	12,98	0,54	4,2%
Pool 3	10	42,41	2,08	4,9%

N = experimentos em duplicata, em um período de 7 dias

**Análise comparativa**

Este teste de ELISA para tirotropina foi comparado com método análogo por imunoluminescência. Amostras biológicas (N = 170) de populações com hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo foram utilizadas (valores entre 0,01 e 41  $\mu\text{UI/mL}$ ). As médias, a equação de regressão e o coeficiente de correlação obtidos, apresentados na Tabela 4, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

**TABELA 4 - Análise comparativa**

Método	Média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação
ELISA (x)	4,54	$y = 0,47 + 0,968 (x)$	0,995
referência (y)	4,21		

**Sensibilidade**

A sensibilidade deste teste de ELISA para TSH foi calculada por determinação da variabilidade do soro-padrão com 0  $\mu\text{UI/mL}$ , utilizando 2 dp (95%) para calcular a dose mínima.

Para 1 hora de incubação: sensibilidade de 0,078  $\mu\text{UI/mL}$

Para 2 horas de incubação: sensibilidade de 0,027  $\mu\text{UI/mL}$

**Especificidade**

A possível reatividade cruzada deste método de ELISA para TSH foi calculada como a razão entre a dose de substância interferente e a dose de hormônio necessária para obter a mesma absorbância.

**TABELA 5 - Reatividade Cruzada**

Substância	Reatividade cruzada	Concentração
hTSH	1,0000	--
hFSH	< 0,0001	1000 ng/mL
hLH	< 0,0001	1000 ng/mL
hCG	< 0,0001	1000 ng/mL

#### Correlação entre os tempos de incubação

Os procedimentos utilizando 1 hora ou 2 hs de incubação foram comparados, utilizando amostras biológicas (N = 30) com valores de TSH entre 0,1 e 18  $\mu\text{UI/mL}$ . A equação de regressão e o coeficiente de correlação obtidos, apresentados na Tabela 6, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

**TABELA 6 – Comparação entre tempos de incubação**

Tempo	Equação de regressão	Coefficiente de correlação
1 h (x)	$y = 0,119 + 0,986 (x)$	0,998
2 h (y)		

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Young DS et al. Clin Chem 21: 3660, 1975.
2. Caldwell G et al. Lancet 1: 1117, 1985.
3. Hopton MR & Harrap JJ. Clin Chem 32: 691, 1986.
4. Beck-Peccoz P & Persani L. Eur J Endocrinol 131: 331, 1994.
5. Spencer CA et al. Clin Chem 41: 367, 1995.
6. Bravermann LE. Clin Chem 42: 174, 1996.
7. Fisher DA. Clin Chem 42: 135, 1996.

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda** –

CNPJ: 03654699000100

Av. José Cândido da Silveira 2100 - sl 10 – Horto – 30130-780 - Belo Horizonte, MG, Brasil  
– Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452. ANVISA: **8004957.0140**