

PATHOZYME® THYROID STIMULATING HORMONE Ref OD387

Enzimaimunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa de TSH no soro humano. Conservar de 2°C a 8°C. NÃO CONGELAR. Somente para Uso Diagnóstico in vitro.

INTRODUÇÃO

A determinação no soro ou plasma dos níveis do Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH) é reconhecida como um método sensível no diagnóstico do Hipotireoidismo Primário e Secundário. TSH é secretado no lóbulo anterior da glândula pituitária e induz a produção de Tiroxina (T4) e Triiodotironina (T3) pela glândula tireóide. Estruturalmente TSH é uma glicoproteína (28.000 dalton) que consiste de cadeias químicas diferentes alfa e beta. Apesar de o nível normal de TSH no sangue ser extremamente baixo, é essencial para a atividade normal da glândula tireóide. A liberação de TSH é regulada pelo Hormônio de Liberação de TSH (TRH) produzido no hipotálamo. Os níveis de TSH e TRH estão inversamente relacionados ao nível dos hormônios da tireóide. Quando houver altos níveis de TSH no sangue, haverá liberação de uma quantidade menor de TRH pelo hipotálamo e consequentemente uma menor quantidade de TSH será secretado pela pituitária. Este processo conhecido como mecanismo de feedback negativo é responsável pela manutenção de níveis adequados de TSH no sangue. TSH e glicoproteínas Pituitárias: Hormônio Luteinizante (LH), Hormônio Foliculo Estimulante (FSH) e Gonadotropina Coriônica humana (hCG) possuem cadeias alfa idênticas. Em cada caso, a cadeia beta é distinta, apesar de haver seqüências idênticas de aminoácidos, que podem causar considerável reação cruzada com algum anti-TSH policlonal. O uso de anticorpos monoclonais em PATHOZYME TSH elimina essa interferência capaz de resultar em falsos valores elevados de TSH tanto em mulheres na menopausa como em mulheres grávidas; uma população onde a avaliação do status da tireóide é clinicamente significativa. As seguintes preparações foram testadas como negativas: HCG (OMS 2º Padrão Internacional 61/2) a 200,000 mIU/ml, FSH (OMS 2º Preparação Internacional Referência HMG) a 200 mIU/ml, LH (OMS 1º Preparação Internacional Referência 75/504) a 200ng/ml e HGH (OMS 1º Preparação Internacional Referência 65/217) a 200 ng/ml.

FINALIDADE DE USO

Pathozyme TSH é um Enzimaimunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa de Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH) no soro humano. Somente para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

As cavidades da microplaca são revestidas com anticorpos específicos anti-TSH. Aplica-se o soro teste. Adiciona-se o conjugado anti-TSH de cabra / peroxidase. A molécula de TSH humano presente na amostra vai combinar com o anticorpo na cavidade e o conjugado enzimático, formando um sanduíche entre a fase sólida e os anticorpos ligados à enzima. Após a incubação, o material não ligado é removido por lavagem e em seguida adiciona-se o substrato (TMB). A cor se desenvolverá somente nas cavidades onde a enzima estiver presente indicando a presença de TSH. A reação enzimática é interrompida pela adição da Solução Bloqueadora e a absorbância é medida a 450 nm. Este teste foi calibrado segundo a 2ª Preparação Referência Internacional NIBSC TSH 1983 80/558.

CONTEDUOS

Ref
OD387



Microtitre Plate		12 x 8 cavidades x 1
Cavidades sensibilizadas com anticorpos específicos, acondicionadas em embalagens de alumínio com dessecante, que podem ser seladas novamente.		
Cal	A	0 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano livre de TSH. Liofilizado. (incolor)		
Cal	B	0.5 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano com TSH diluído. Liofilizado. (incolor)		
Cal	C	2 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano com TSH diluído. Liofilizado. (incolor)		
Cal	D	5 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano com TSH diluído. Liofilizado. (incolor)		
Cal	E	10 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano com TSH diluído. Liofilizado. (incolor)		
Cal	F	25 µl UI/ml
Padrão referência: soro humano com TSH diluído. Liofilizado. (incolor)		
Washbuf	20X	50 ml
Solução substrato (TMB) Pronto para uso. (incolor)		
Conj		5.5ml
Conjugado TSH/HRP concentrado. Pronto para uso. (roxo)		
Subs	TMB	11ml
Solução substrato (TMB) Pronto para uso. (incolor)		
Soln	Stop HCl	1M
Solução Stop: Ácido Clorídrico diluído em água purificada. Pronto a usar. (incolor)		
Instruções de uso. Folha de Registro de Dados EIA		1+1

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas: 100, 200, 1000 e 5000 µl.
- Ponteiras descartáveis
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Papel gráfico
- Vidraria de laboratório limpa

PRECAUÇÕES

PATHOZYME TSH contém materiais de origem humana que foram testados e confirmados com resultado negativo para anticorpos anti-HCV, anti-HIV I e II e HBsAg através de procedimentos aprovados, sendo realizados para cada doador. Como nenhum teste pode oferecer uma completa segurança que produtos derivados de material humano não transmitam agentes infecciosos, recomenda-se que os reagentes contidos neste kit sejam manuseados com o devido cuidado e atenção durante o uso e descarte. Todos os reagentes devem portanto ser tratados como material de potencial risco biológico durante o uso e descarte. Não ingerir.

PATHOZYME TSH não contém substâncias perigosas como definido no regulamento UK Chemicals (Informações e Embalagem para fornecimento de material de Risco). Entretanto, todos os reagentes devem ser tratados como de risco biológico potencial durante o uso e descarte. O descarte final deve ser realizado de acordo com a legislação local.

A solução stop PATHOZYME TSH é de Ácido Clorídrico sendo, portanto, corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

PATHOZYME TSH contém reagentes com 1% Proclin™ 300* como conservante, que pode ser tóxico caso seja ingerido. Em caso de contato, lavar com água corrente em abundância.

* Proclin™ 300 é uma marca comercial pertencente a ROHM e HAAS limitada.

ARMAZENAMENTO

Os reagentes devem ser armazenados a temperatura entre 2°C a 8°C.

A data de vencimento é o último dia do mês indicado nos rótulos dos frascos e do kit. O kit funcionará dentro das especificações até a data de vencimento estipulada, baseada na data de fabricação do produto e impressa no kit e em seus componentes. Não utilizar os reagentes após a data de vencimento.

Evitar a exposição a temperaturas excessivas. Não expor diretamente a luz solar.

NÃO CONGELAR NENHUM DOS REAGENTES pois isso causará danos irreversíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Obter uma amostra de sangue venoso do paciente, permitindo que o coágulo seja formado e retraído. Centrifugar a amostra de sangue coagulada e coletar o soro límpido. O teste requer amostra de soro fresco.

Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico para o teste, pois isso afetará desfavoravelmente os resultados.

O soro pode ser armazenado a 2°C a 8°C por até 48 horas antes do uso. Se for necessário um armazenamento mais longo, armazenar a -20°C por até 1 ano. Amostras descongeladas devem ser homogêneas antes do uso.

Não usar azida sódica como conservante pois esta poderá inibir o sistema enzimático peroxidase.

Não congelar e descongelar repetidamente o soro, pois isso pode causar resultados falsos.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20° a 25°C) e devem ser homogêneos antes do uso. Evitar a formação de espuma.

Padrões: Adicionar 1ml de água destilada a cada frasco de padrão para a sua reconstituição.

Deixar descansar por no mínimo 20 minutos antes de usar. Os padrões rehidratados serão estáveis por até 30 dias quando armazenados de 2°C a 8°C. Para um maior período armazenar selado a -20°C quando não estiver em uso. Padrões descongelados devem ser homogêneos suavemente antes do uso.

Tampão de lavagem
Diluir o Tampão de Lavagem concentrado utilizando 1 parte do Tampão de Lavagem concentrado com 19 partes de água destilada. Para cada tira com oito cavidades, preparar 25 ml de tampão diluído pela adição de 1.25 ml de tampão de lavagem concentrado a 23.75 ml de água destilada. Preparar a solução tampão de lavagem diluída antes de cada ensaio. Tampão de Lavagem extra é fornecido para equipamentos de lavagem automatizados.

O procedimento de lavagem é crítico para os resultados deste teste. Lavagem insuficiente resultará em uma fraca precisão e leituras de absorbâncias falsamente elevadas.

LIMITAÇÕES DE USO

A utilização de outras amostras que não sejam soro, não foi validada para este teste. Não existe protocolo para a reutilização deste produto. Levar em conta todos os dados clínicos na interpretação dos testes. O diagnóstico não deve ser feito baseado somente nos dados de um ensaio clínico.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Deixar todos os componentes do kit e o soro teste atingirem a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de iniciar o ensaio.
2. Um conjunto de padrões do kit deve ser testado com cada grupo de amostras. Selecionar o número de cavidades desejadas prendendo-as no suporte. Anotar a posição do soro controle e dos soros testes na "Folha de Registro de Dados EIA" fornecida.
3. As tiras que não forem usadas devem ser seladas novamente na embalagem de alumínio contendo o dessecante, utilizando-se o selador "zip-lock", antes de serem recolocadas 2°C a 8°C.
4. Dispensar 100µl de padrões e soro teste em cada cavidade determinada.
5. Dispensar 100µl de conjugado anti-TSH em cada cavidade. Homogeneizar completamente por 30 segundos. É muito importante misturar completamente.
6. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente de 20°C a 25°C.
7. Lavagem Manual: Verificar se cada poço tem 300µl de água destilada e que o desinfetante apropriado é adicionado ao frasco de colecta de desperdício. Após a lavagem, retirar fluido em excesso passando os poços por papel absorvente ou toalhas de papel para remover os resíduos de líquido. Lavar 5 vezes.
8. Preencher as cavidades com um mínimo de 300 µl de Tampão de Lavagem por cavidade. Despejar o tampão de dentro das cavidades para o interior do recipiente de material contaminado. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Lavar as cavidades vazias 5 vezes.
9. Bater as cavidades sobre um papel absorvente ou papel toalha para remover todo o resíduo de água.
10. Lavagem automática: assegurar-se que 300 µl de Tampão de Lavagem serão dispensados por cavidade e que o recipiente de material contaminado contém um desinfetante apropriado. Lavar as cavidades vazias 5 vezes. Após lavagem remover o excesso de fluido batendo as cavidades sobre papel absorvente ou papel toalha, para retirar todo o resíduo de água.
11. Dispensar 100 µl da Solução Substrato em cada cavidade e homogeneizar suavemente por 5 segundos.
12. Incubar no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
13. Interromper a reação pela adição de 100 µl da Solução de Bloqueio em cada cavidade.
14. Misturar suavemente por 30 segundos para certificar-se que a cor azul mudará completamente para amarelo.
15. Ler a densidade óptica a 450 nm com um leitor de microplacas imediatamente após o bloqueio da reação.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Para uso por operadores com um mínimo de treinamento básico em laboratório.

Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados.

Utilizar ponteiros separadas para cada amostra a fim de prevenir a contaminação cruzada.

Teste em duplicata dos padrões e amostras, apesar de não requerido, é recomendado.

As amostras e controles devem ser testados ao mesmo tempo para que as condições do teste sejam as mesmas.

Caso se realize pipetagem manual, recomenda-se não se utilizar mais que 32 cavidades em cada ensaio e que a pipetagem de todos os padrões e amostras seja realizada dentro de 3 minutos. Uma placa completa de 96 cavidades pode ser utilizada se houver disponibilidade de pipetagem automatizada.

Recolocar as tampas em todos os reagentes imediatamente após o uso.

Evitar pipetagens repetidas dos reagentes estoques porque isso poderá causar contaminação.

Não misturar reagentes ou cavidades marcadas com anticorpos de diferentes kits. Cuidado para não tocar a superfície da cavidade durante a dispensação.

Evitar que os reagentes escorram pela parede da cavidade. Antes de iniciar o teste deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente (20° - 25°C).

Homogeneizar todos os reagentes, com cuidado, por inversão ou rotação.

Uma vez iniciado o teste não deixar que as cavidades sequem.

Não contaminar a Solução Substrato o que inutilizará o kit.

Checar a precisão e exatidão dos equipamentos laboratoriais utilizados durante o procedimento para assegurar resultados reprodutíveis.

As tiras não utilizadas devem ser seladas novamente dentro da embalagem de alumínio contendo o dessecante, utilizando-se para isso o "zip-lock" e armazenadas a 2°C a 8°C.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcular a absorbância de cada padrão e amostras. Construir uma curva padrão em um papel gráfico, colocando os valores obtidos das absorbâncias de cada padrão versus a sua concentração em µU/ml, com os valores da absorbância no eixo Y e as concentrações no eixo X. Usar os valores de absorbância de cada amostra para determinar a concentração correspondente de TSH em µU/ml utilizando a curva padrão.

Se os níveis dos calibradores ou amostras conhecidas não fornecerem os resultados esperados, os resultados dos testes devem ser considerados inválidos.

VALORES ESPERADOS E SENSIBILIDADE

O gráfico produzido pelos calibradores deve ter a forma de uma hipérbole com a DO 450 dos calibradores proporcional as suas concentrações.

A DO do calibrador A deve ser menor que 0,2 e a DO do calibrador F deve ser maior que 1,5 para que os resultados dos testes sejam válidos. Valores normais para adultos com idade entre 21 e 54 anos são de 0,4 a 4,2µU/ml subindo para 0,5 a 8,9µU/ml entre as idades de 55 e 87.

Durante a gravidez as faixas de normalidade são as seguintes:

1º trimestre 0,3 a 4,5µU/ml, 2º trimestre 0,5 a 4,6µU/ml e 3º trimestre 0,8 a 5,2 µU/ml. Tem se observado que concentrações de 1,000µU/ml usando-se **PATHOZYME TSH** não causa efeito prozona.

AVALIAÇÃO DOS DADOS

Calibrado em relação aos maiores competidores e padrões internos.

O coeficiente de variação do **PATHOZYME TSH** é menor ou igual a 10%

Uma avaliação entre o kit Omega **PATHOZYME TSH** e o kit Immulite 2000 DPC TSH para amostras com níveis entre 0,4 e 63 µU/ml forneceu os seguintes resultados:

Numero de amostras	56
Coefficiente de correlação	0.994
Inclinação	0.920
Intercepção	0.787
Omega	8.39µU/ml
DPC	9.41µU/ml

Os kits mostraram uma boa correlação entre si.

REFERÊNCIAS

- 1- Soos, M, Siddle, K. J. Immunol. Methods 1982;51:57- 68.
- 2- Wada, HG, Danisch, RJ et al. Clin. Chem. 1982; 28:1862-1866.
- 3- Uotila, M. Et al. J. Immunol. Methods 1981; 42: 11-15.
- 4- Burger, HG, et al. Clinic Endocrinol. Metab. 1977;6:831.
- 5- Snyder,PJ et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 1972;34:380-385.

PROCEDIMENTO RÁPIDO

1. Dispensar 100µl do soro teste ou padrões e 100µl de Conjugado de Enzimas em cada cavidade. Misturar gentilmente por 30 segundos.
2. Incubar 60 min. a temperatura ambiente (20° C a 25°C).
3. Descartar os conteúdos das cavidades e lavar 5 vezes com Tampão de Lavagem.
4. Adicionar 100 µl de Solução Substrato em cada cavidade. Misturar gentilmente por 5 segundos.
5. Incubar no escuro por 20 min. a temperatura ambiente (20° C a 25° C).
6. Adicionar 100 µl de Solução Bloqueadora em cada cavidade e misturar gentilmente por 30 segundos.
7. Ler a Densidade Óptica imediatamente (no máximo 10 min) usando um leitor de microplacas com filtro de 450 nm.

8088 ISSUE 6 Revised November 2005 PORTUGUESE
©Omega Diagnostics Ltd., 2005



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY