

Thymune T

Thymune M

Thymune T e M são kits para detecção semiquantitativa de auto-anticorpos associados a lesões inflamatórias destrutivas da glândula tireóide por hemaglutinação de hemácias de peru sensibilizadas. O diagnóstico da presença de auto-anticorpos contra os antígenos tireoglobulina e microssomal no soro do paciente é de fundamental importância no diagnóstico das tireoidites ou desordem da tireóide.

Thymune T

R30850601 – 50 testes

Detecta a presença do anticorpo anti-tireoglobulina no soro, por hemaglutinação de hemácias de peru sensibilizadas com antígeno tireoglobulina humano.

Thymune M

R30850501 – 50 testes

Detecta a presença do anticorpo anti-microssomal no soro, por hemaglutinação de hemácias de peru sensibilizadas com antígeno microssomal humano.

INSTRUÇÕES DE USO

THYMUNE – T (CÓD. R30850601) - 50 TESTES

Kit de hemaglutinação para detecção de antígeno tireoglobulina da tireóide humana.

Uso Pretendido

O Thymune-T é usado para a determinação semi-quantitativa de auto-anticorpos para antígeno tireoglobulina da tireóide humana.

Resumo e Explicação do Teste

Este teste é baseado no sistema de hemaglutinação passiva de Boyden, primeiramente usado para detecção de anticorpos tireoglobulinas por Witebsky e Rose⁸. Células revestidas com antígenos tireoglobulina são aglutinadas por auto-anticorpos específicos resultando em uma camada de células no fundo da cavidade de microtitulação; a falta de aglutinação é indicada pelas células fixadas na forma de um anel ou um botão. Desde a demonstração de precipitados de tireoglobulina no soro de pacientes com a doença de Hashimoto^{6,9}, foi estabelecido que auto-anticorpos para vários componentes diferentes da tireóide¹⁴ estão associados com lesões inflamatórias destrutivas da glândula tireóide. Anticorpos para dois destes componentes, isto é, tireoglobulina e o antígeno microsomal, são de especial importância para fins diagnósticos^{3,5,7}.

Princípio do Teste

Proteínas como as tireoglobulinas são prontamente ligadas à superfície das hemácias que foram tratadas com ácido tânico. Tireoglobulina extraída da glândula tireóide humana por técnicas clássicas de precipitação salina acoplada a hemácias curtidas de peru fornece um sistema de teste de hemaglutinação para a detecção de baixos níveis de anticorpo para tireoglobulina. Uma pequena proporção de soro humano é reativa contra células de peru, dando aumento a nenhuma aglutinação específica das células sensibilizadas. Estas reações não específicas podem ser detectadas por meio de Células Controle não sensibilizadas. Ambas as Células Teste e Controle são tratadas com formalina e liofilizadas para dar longa estabilidade no armazenamento.

Reagentes

1. Células Teste – 5 frascos

Cada frasco de Células Teste contém o liofilizado equivalente a 3 ml de suspensão contendo 1% de eritrócitos de peru curtos tratados com aldeído e revestidos com tireoglobulina humana dispersos em fosfato salino tamponado pH 7,2, contendo 5% de sacarose, 1,5% de soro normal de coelho e Bronopol® 0,01%.

2. Células Controle – 1 frasco

Cada frasco de Células Controle contém o liofilizado equivalente a 3 ml de suspensão contendo 1% de eritrócitos de peru curtos tratados com aldeído dispersos em fosfato salino tamponado pH 7,2, contendo 5% de sacarose, 1,5% de soro normal de coelho e Bronopol® 0,01%.

3. Diluente – 2 frascos

Cada frasco contém 25 ml de solução salina isotônica contendo soro normal humano, soro normal de peru e 0,1% de Azida sódica. Os volumes de soros adicionados são ajustados para dar bons resultados com cada grupo de células sensibilizadas e os componentes de um kit não podem ser usados com os componentes de qualquer outro kit.

4. Soro Controle Positivo – 1 frasco

Cada frasco contém 1,0 ml de soro de carneiro anti-tireoglobulina com uma taxa de hemaglutinação de aproximadamente 1/640 com Células Teste. As Células Controle devem mostrar padrões de não aglutinação em todas as diluições. Uma falha ao reagir como descrito, é indicativo de deterioração das Células Controle ou Teste, ou de contaminação do Diluente. O Soro contém Azida sódica a 0,1%.

5. Soro Controle Negativo – 1 frasco

Cada frasco contém 1,0 ml de soro normal humano, não-reativo para HBsAg e para anticorpos para o vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2), não devendo causar aglutinação das Células Controle ou Teste a qualquer diluição. Uma falha ao reagir como descrito, é indicativo de deterioração das Células Controle ou Teste, ou de contaminação do Diluente. O Soro contém Azida sódica a 0,1%.

Advertências e Precauções

1. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

2. **CUIDADO:** Este kit contém componentes de origem humana. Nenhum método pode oferecer garantia completa que os produtos derivados de origem humana não transmitirão infecção. Assim, todos os materiais de origem humana devem ser considerados como potencialmente infectantes. É recomendado que estes reagentes e amostras humanas sejam manuseados usando Normas Práticas de Trabalho em Laboratório previamente estabelecidas.

3. Alguns componentes do kit contêm azida sódica a 0,1%. Note que as azidas podem reagir com cobre e chumbo usados em alguns sistemas de encanamento formando sais explosivos. As quantidades usadas neste kit são pequenas; mesmo assim, ao descartar materiais contendo azida sódica, eles devem ser despejados com grande quantidade de água.

Reconstituição

As Células Teste e Controle devem ser reconstituídas com 3 ml de água destilada utilizando o procedimento: Bater levemente o frasco na mesa de trabalho para remover qualquer sólido aderido a rolha. Cuidadosamente, retirar a tampa e a rolha de borracha e adicionar 3 ml de água destilada. Recolocar a rolha de borracha e agitar para ajudar a dispersão do reagente.

Deixar o frasco parado até que uma dispersão completa tenha ocorrido, então inverter o frasco e agitar de novo para assegurar uma mistura completa. Para melhor desempenho do teste as células devem ser reconstituídas pelo menos 30 minutos antes de usar.

Armazenamento e Vida Útil dos Reagentes

Antes da reconstituição, os reagentes devem ser armazenados a 2-8°C, quando manterão sua potência até a data indicada no rótulo.

Uma vez reconstituídas, as suspensões de células irão se manter estáveis a 2-8°C por 5 dias. Para um armazenamento prolongado das Células Teste (até um mês) a suspensão celular deve ser congelada a -20°C e descongelada somente uma vez.

As Células Controle podem ser dispensadas em pequenos volumes e armazenadas congeladas por até 18 meses.

O Diluente e os Soros Controle podem ser armazenados a 2-8°C. O Diluente é estéril na hora da aquisição do mesmo e todo esforço deve ser feito para evitar contaminação bacteriana do Diluente ou dos Soros Controle durante o uso.

Coleta e Armazenamento das Amostras de Teste

Sangue coletado por punção venosa deve coagular naturalmente e o soro deve ser clarificado por centrifugação antes do teste. Se for necessário armazenar as amostras antes de testá-las, elas devem ser mantidas congeladas a -20°C. Evite ciclos de congelamento e descongelamento. Todos os soros de pacientes devem ser inativados por calor a 56°C por 30 minutos antes do teste.

Amostras de plasma não são adequadas para teste.

Materiais Fornecidos

Células Teste e Controle, Diluente e Soros Controle Positivo Negativo estão incluídos no kit.

Materiais Necessários mas Não Fornecidos

Os seguintes equipamentos são necessários além dos materiais normalmente disponíveis no laboratório:

- Placas descartáveis ou reutilizáveis de microtitulação com fundo em "U" ou em "V".
- Dispensadores de 0.025 ml
- Micropipetas (multicanal) ou microdiluidores de 0.025 ml

Notas

Embora o teste possa ser feito em placas de cavidades em "U" ou em "V", as características de desempenho confirmam-se usando o tipo de cavidade em "U". Onde houver preferência por cavidades em "V", é recomendado que o manipulador esteja familiarizado com os padrões de reação exibidos. Algumas marcas de placas de microtitulação dão resultados inferiores; assim, somente os tipos de placas recomendados devem ser usados.

(1)Dispensadores e microdiluidores e micropipetas podem ser adquiridos pelos distribuidores específicos.

(2)As micropipetas fornecem resultados mais precisos e reprodutíveis do que os microdiluidores e devem ser usadas sempre que possível para titulação das amostras. Ao se microdiluidores, deve-se tomar cuidado para assegurar que eles tenham precisão volumétrica.

Procedimento do Ensaio Thymune-T

Uma fileira completa (cavidades 1-12) da placa de microtitulação é necessária para cada amostra ou controle a ser testado. Os de Soros Controle Positivo e Soro Controle Negativo devem ser incluídos a cada leva de testes e tratados como os soros de pacientes. Os soros de pacientes devem ser inativados pelo calor a 56°C por 30 minutos.

PASSO 1

Utilizando um dispensador padrão de 0.025 ml, adicionar 4 gotas do diluente nas cavidades 1 e 1 gota nas cavidades de 2 a 12.



PASSO 2

Pipetar 0.025 ml de soro na cavidade 1. Utilizando uma micropipeta ou um microdiluidor, misturar e transferir 0.025 ml para a cavidade 2 – esta é a cavidade do soro controle. Descartar 0.025ml da cavidade 2

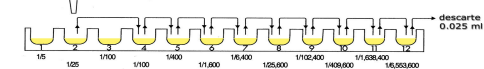


PASSO 3

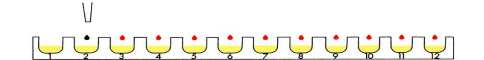
Com uma ponteira de micropipeta nova ou microdiluidor limpos, transferir 0.025 ml da cavidade 1 para a cavidade 3, misturar e transferir 0.025ml para a cavidade 4. Continuar as diluições até a cavidade 12. Descartar 0.025 ml da cavidade 12.

PASSO 4

Imediatamente adicionar 0.025 ml de Células Controle na cavidade 2 e 0.025 ml de Células Teste nas

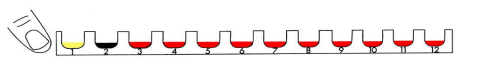


cavidades de 3 a 12.



PASSO 5

Misturar os componentes em um agitador de placas por no mínimo 30 segundos ou batendo de leve a placa nos seus quatro lados.



CUIDADO: Uma falha ao misturar apropriadamente ou o uso de um agitador de placas a uma velocidade muito baixa irá resultar em estabelecimento irregular de padrões e em uma sensibilidade menor.

Cobrir a placa com uma tampa para evitar evaporação / contaminação.

Deixar a placa se estabilizar a temperatura ambiente (18 a 30°C) longe da luz direta do sol e livre de qualquer vibração.

Fazer a leitura após 30-60 minutos.

Resultados do Teste

Em um teste positivo, as células sensibilizadas são aglutinadas por anticorpo e fixadas no fundo da cavidade como um tapete espalhado. Em um teste *negativo*, as células se fixam como um pequeno círculo ou botão compacto no fundo da cavidade. O ponto final do teste deve ser considerado como a maior diluição da amostra dando aproximadamente 50% de aglutinação das Células Teste. Uma pró-zona (uma ou mais cavidades mostrando fraca aglutinação inesperada) é algumas vezes vista a baixas diluições de alguns soros positivos e deve-se ter cuidado para não interpretar errado tais resultados.

Se uma aglutinação completa estiver presente na diluição final de 1/5120, prepare uma diluição 1/100 do soro no diluente fornecido e titule como uma amostra normal. Se um ponto final ainda não for obtido, repita a titulação começando com uma diluição maior, por exemplo 1/1000.

a) Resultados típicos obtidos com o ensaio Thymune-T

A ilustração mostra oito titulações em uma placa de microtitulação com cavidades em "U". As titulações foram feitas utilizando micropipetas. A segunda cavidade de cada fileira contém Células Controle com uma diluição 1/10 de soro. As cavidades de 3 a 12 contêm diluições duplas de soro desde 1/10 com Células Teste.

Fileira A – Positivo 1/320
Fileira B – Negativo

Fileira C – Positivo 1/160
Fileira D – Positivo 1/20 – 1/40
Fileira E – Positivo 1/1280
Fileira F – Negativo
Fileira G – Positivo 1/640
Fileira H – Positivo 1/40

b) Validação do Teste

A Cavidade Controle (coluna 2) deve ser sempre negativa. Reações heterofílicas anti-peru não são comuns a diluições de 1/10 ou maior, mas se a cavidade de controle mostrar aglutinação a amostra de soro deve ser absorvida misturando as células aglutinadas de 0.5 ml da suspensão das Células Controle com 0.1 ml do soro teste. Agitar a mistura, deixar parado por 10 minutos e então separar o soro absorvido por centrifugação.

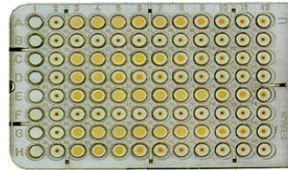
Repita o teste utilizando o soro absorvido. Controles de Soro Positivo e Negativo são fornecidos para assegurar o funcionamento adequado do Teste e das suspensões das Células Controle.

O Soro Negativo não deve causar aglutinação em qualquer diluição, enquanto que o Soro Positivo deve produzir aglutinação a uma diluição de 1/640 (em cavidades em "U"), mais ou menos uma diluição dupla. As titulações observadas em cavidades em "V" são um pouco maior. Uma falha ao demonstrar uma titulação aceitável para o Controle de Soro Positivo indica que o teste não teve a sensibilidade correta e deve ser repetido.

Interpretação dos Resultados

Testes de hemaglutinação passiva (HÁ) para auto-anticorpos para tireoglobulina são 1.000 vezes mais sensíveis que testes de precipitação e pacientes com doença de Hashimoto com precipitação positiva deram taxas de hemaglutinação (HÁ) de 640 para muitos milhões. A combinação de testes de hemaglutinação microssomal e de tireoglobulina irá detectar praticamente todos os bóciós de Hashimoto e 90% dos casos de mixoedema primário. Os dois testes devem ser feitos juntos em todos os casos de bócio a serem operados uma vez que nem sempre é possível clinicamente distinguir tireoidite autoimune de outros tipos de bócio. Uma outra aplicação importante dos dois testes de anticorpo tireoidiano é o diagnóstico diferencial de tireotoxicose primária e várias taquicardias, estágios de ansiedade, perda de peso inexplicável ou diarreia. Em casos de exoftalmose unilateral os testes irão ajudar a diferenciar entre um etiologia endócrina e lesões orbitais locais, evitando testes mais invasivos e caros. Por volta de 70-90% dos casos com variantes da doença de Graves deram taxas de hemaglutinação microssomal e/ou de tireoglobulina positivas comparadas com 10-15% de controles de acordo com a idade e o sexo. Embora a maioria dos indivíduos tireotóxicos mostrem níveis relativamente baixos de anticorpo, por volta de 20% têm níveis moderados a altos (Tireoglobulina > 1/640. Microssomal > 1/6400) e isto indica ou uma forma mais severa da doença com uma

tendência a recaída, ou uma tireoidite concomitante destrutiva predispondo a um mixoedema ou a uma perda espontânea da função tireoidiana alguns anos após o episódio tireotóxico. Similarmente, hemaglutinação microssomal combinada com a de tireoglobulina irá distinguir entre tireoidite atrofiada e hipotiroidismo leve ou severo e casos de depressão ou obesidade devido a outras causas. Resultados positivos nestes dois testes não são suficientes para excluir câncer tireoidiano, nem os baixos níveis (Tireoglobulina < 1/160, Microssomal < 1.1600) são sempre indicativos de lesões tireoidianas severas, uma vez que vários casos de tireoidite focal mantêm-se subclínicos ou não-progressivos. Se um resultado positivo é obtido, investigações suplementares como exames para câncer tireoidiano, testes TRH para autonomia tireoidiana ou estimações de TSH do soro para suspeita de hipotiroidismo são necessários, sendo que a escolha do teste é dependente dos achados clínicos. Testes de hemaglutinação microssomal e de tireoglobulina fornecem evidências úteis de possível disfunção tireoidiana em pacientes com outras desordens endócrinas autoimunes



doença de Addison, Diabetes mellitus insulina-dependente ou auto-imunopatias poliendócrinas, e em membros de famílias propensos a autoimunidade órgão-específica.

Limitações do Procedimento

Plasma e soro infectados não são adequados para o teste.

Características de Desempenho

Uma comparação da **sensibilidade** do Thymune-T com a técnica de hemaglutinação de células de carneiro foi feita testando soros de 158 pacientes conhecidos por ter bócio de Hashimoto, mixoedema primário ou tireotoxicose.

Uma boa correlação entre os dois sistemas de teste foi achada com uma faixa de níveis variando entre < 1/10 a > 1/5120².

Ao testar soros de doadores de sangue normais, a incidência de resultados positivos foi de 4% com a maioria dos níveis sendo de 1/20².

Os reagentes são cuidadosamente controlados para assegurar produtividade entre os lotes. Cada lote de Células Teste é preparado para atingir níveis consistentes quando testados contra um painel de soros contendo níveis conhecidos de anticorpo, com uma tolerância de não mais que uma diluição dupla.

A **reprodutibilidade** lote a lote foi demonstrada testando 12 amostras em 3 ocasiões usando três lotes de reagentes. Cada amostra forneceu resultados consistentes com uma faixa de mais ou menos uma diluição dupla em todas as ocasiões^{2,10}.

* Marca Registrada

Bronopol® é Marca Registrada da Boots The Chemist Co.

A **estabilidade** foi comprovada através de estudos nos Laboratórios Remel Europe Limited (Inglaterra – Departamento Regulatory Affair Dr M.A.Creswell), com temperaturas variando entre +4°C, +25°C e +37°C e em períodos de estocagem variando entre 8 semanas a 30 meses. Esses estudos

demonstraram que o produto **THYMUNE T KIT**, se manterá apropriado para uso com uma validade de 23 meses a temperatura de 2-8°C.

Bibliografia:

1. Anderson, J.R., Goudle, R.B. and Gray, K.G. ,(1959). Scot. Med. J. 4,64
2. Cayzer, I., Chaimers, S.R., Doniach, D. and Swana, G. (1978). *J. Clin. Path.* 31,1147
3. Donlach, D. (1975). *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 4, Part 2, p.267, Irvine, W.J.
4. Donlach, D. and Roitt, I.M. (1962). *Ann. Rev. Med.*, 13,213
5. Donlach, D. and Roitt, I.M. (1976). *Clinical aspects of immunology 3rd edition*, ed. P.G.H. Gell, R.R.A Coomes and P.J. Lachmann, Blackwell, Oxford.
6. Roitt, I.M., Donlach, D., Campbell, P.N. and Vaughan-Hudson, R. (1956). *Lancet*, ii, 820.
7. Vallée, G., Izembart, M. and Thonnet, M. (1982). *Ann. Biol. Clin.*, 40, 651-656
8. Witebsky, E. and Rose, N.R. (1956). *J. Immunol.* 76, 408
9. Witebsky, E., Rose, N.R., Terplan, K, K.,Paine, J.R. and Egan, R.W. (1957). *J. Amer. Med. Ass.*, 164,1439.
10. Data on File, Remel

EDIÇÃO INSTRUÇÃO DE USO: JUNHO/2003

LOTE, DATA DE FABRICAÇÃO E VALIDADE: VIDE RÓTULOS DOS FRASCOS E KIT

FABRICADO POR: REMEL EUROPE LIMITED, Clipper Boulevard West, Crossways, Dartford, Kent, DA2 6PT, Inglaterra

IMPORTADO POR: OXOID BRASIL LTDA R. Arizona, 1349 8º ANDAR, 04567 – 003 SÃO PAULO – SP

SERVIÇO DE ATENDIMENTO:

FONE/FAX: (011) 5505 – 0014

oxoid@oxoid.com.br