



Key Code TSMX7822A
www.oxid.com/ifu

Europe +800 135 79 135 US 1 855 2360 190
CA 1 855 805 8539 ROW +31 20 794 7071

Thymune*-M

REF R30850501  50 **PT**

1. USO PRETENDIDO

O Thymune*-M é utilizado para a medição semi-quantitativa dos auto-anticorpos para o antigénio microssomal da tiróide humana.

2. RESUMO E EXPLICAÇÃO DO TESTE

Este teste baseia-se no sistema de hemaglutinação passiva de Boyden, utilizado pela primeira vez por Witebsky e Rose⁸ para detectar anticorpos para a tiroglobulina. As células revestidas com antigénios microssomais são aglutinadas por auto-anticorpos específicos, formando um tapete uniforme de células no fundo da cavidade de microtitulação; a ausência de aglutinação é caracterizada pela formação de um espesso anel ou botão de células. Quando as precipitinas da tiroglobulina foram identificadas no soro de indivíduos com a doença de Hashimoto^{6,9}, foi estabelecido que os auto-anticorpos para vários constituintes da tiróide^{1,4} estão associados a lesões inflamatórias destrutivas da glândula da tiróide. Os anticorpos para dois destes constituintes, a tiroglobulina e o antigénio microssomal, desempenham um papel importante no processo de diagnóstico^{3,5,7}.

3. PRINCÍPIO DO PROCEDIMENTO

O antigénio microssomal purificado é isolado das glândulas tirotoxicas humanas através de centrifugação a alta velocidade. A fracção microssomal vai então adsorver-se à superfície dos eritrócitos de peru² tratados com ácido tânico e são estas células “sensibilizadas” que se vão aglutinar na presença dos auto-anticorpos específicos. Uma pequena quantidade de soros humanos é reactiva frente às células de peru, provocando desta forma a aglutinação não-específica das células sensibilizadas. Estas reacções não-específicas podem ser detectadas através das Células de Controlo não-sensibilizadas. As Células de Teste e as Células de Controlo são tratadas com formalina e liofilizadas para obter uma maior estabilidade durante o período de armazenamento.

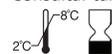
4. REAGENTES

CONTEÚDO DO KIT

1. Células de Teste	5 frascos (tampas brancas)
2. Células de Controlo	1 frasco (tampa branca)
3. Diluente	3 frascos (tampas brancas)
4. Controlo Sérico Positivo	1 frasco (tampa vermelha)
5. Controlo Sérico Negativo	1 frasco (tampa azul)
6. Instruções para Utilização	1

DESCRIÇÃO DOS REAGENTES, PREPARAÇÃO PARA UTILIZAÇÃO E CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO RECOMENDADAS

Consultar também a secção **Avisos e Precauções**.



Antes da reconstituição, os reagentes devem ser armazenados a

uma temperatura entre 2-8°C para se que mantenham activos, pelo menos, até à data indicada nas etiquetas dos recipientes.

As Células de Teste e de Controlo devem ser reconstituídas com 3 ml de água destilada da seguinte forma: Bater o frasco cuidadosamente contra a bancada para eliminar qualquer formação sólida no vedante. Tirar a tampa e o vedante de borracha e adicionar 3 ml de água destilada. Voltar a tapar e agitar para auxiliar a dispersar o reagente. Deixar o frasco em repouso até a dispersão estar aparentemente completa e, então, inverter o frasco e voltar a agitá-lo para assegurar uma homogeneização completa. Para o desempenho otimizado do teste, as células devem ser reconstituídas, pelo menos, 30 minutos antes da sua utilização.

Após a reconstituição, as suspensões de células mantêm-se estáveis durante 5 dias a uma temperatura entre 2-8°C. Para períodos de armazenamento das Células de Teste mais prolongados (até um mês), a suspensão de células tem de ser congelada a uma temperatura entre -15°C e -25°C e descongelada apenas uma vez. As Células de Controlo podem ser dispensadas em pequenos volumes e congeladas durante o período máximo de 18 meses. O Diluente e os Controlos Séricos podem ser sistematicamente armazenados a uma temperatura entre 2-8°C. Durante a utilização do Diluente e dos Controlos Séricos, devem ser tomadas as devidas precauções para evitar a contaminação bacteriana.

TEST CELLS

Células de Teste

Cada frasco de Células de Teste contém o liofilizado equivalente a 3 ml de uma suspensão a 1% de eritrócitos de peru tratados com ácido tânico e aldeído, revestidos com antigénio microssomal, dispersos em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2), contendo sacarose a 5%, 1,5% de soro normal de coelho e Bronopol a 0,01%.

CONTROL CELLS

Células de Controlo

Cada frasco de Células de Controlo contém o liofilizado equivalente a 3 ml de uma suspensão a 1% de eritrócitos de peru tratados com ácido tânico e aldeído, dispersos em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2), contendo sacarose a 5%, 1,5% de soro normal de coelho e Bronopol a 0,01%.

DILUENT

Diluente

Cada frasco contém 25 ml de solução salina isotónica, composta por soro normal negativo para HBsAg e anticorpos para HIV-1, HIV-2 e HCV, soro de peru normal, tiroglobulina humana e azida sódica a 0,1%. Os volumes dos soros adicionados são ajustados para obter resultados otimizados com cada lote de células sensibilizadas. Não misturar os diferentes componentes de cada kit.

CONTROL

Controlo Sérico Positivo

Cada frasco contém 1,0 ml de soro de coelho anti-microssomal diluído. Contém azida sódica a 0,1%.

CONTROL

Controlo Sérico Negativo

Cada frasco contém 1,0 ml de soro humano normal diluído, negativo para HBsAg e anticorpos para HIV-1 e HIV-2 e HCV. Contém azida sódica a 0,1%.

5. AVISOS E PRECAUÇÕES:

IVD

Para utilização *in vitro*.

Apenas para uso profissional.

Consulte a folha sobre dados de segurança do fabricante e o rótulo do produto para obter mais informações sobre componentes potencialmente infecciosos.

INFORMAÇÕES SOBRE SAÚDE E SEGURANÇA

ATENÇÃO: Este kit contém componentes de origem humana. Nenhum método de ensaio pode garantir de forma absoluta que produtos derivados de origem humana não transmitam infecção. Assim sendo, todos os produtos de origem humana devem ser considerados potencialmente infecciosos. Recomenda-se que estes reagentes e amostras humanas sejam manipulados segundo as Boas Práticas de Trabalho Laboratoriais. O soro negativo pode ser utilizado para fabricar o Diluente e o Controlo Negativo foi dado como negativo para o HBsAg e para os anticorpos de HIV e HCV.

- O Diluente e os Controlos Séricos Positivo e Negativo contêm 0,1% de azida sódica. Deve ser tido em atenção o facto de que, em alguns tipos de canalizações, a azida sódica pode reagir com o cobre e o chumbo formando sais explosivos. Apesar das quantidades de azida utilizadas neste kit serem reduzidas, os materiais devem ser despejados com grandes quantidades de água.

PRECAUÇÕES ANALÍTICAS

- Não utilizar os reagentes depois de expirado o prazo de validade.
- Limpar as placas de microtitulação com um pano antes de utilizar, para reduzir a interferência estática.
- Permitir que todos os reagentes e amostras atinjam a temperatura ambiente (18 a 30°C) antes de utilizar. Imediatamente após a utilização, voltar a colocar os reagentes à temperatura de armazenamento recomendada.
- Todos os testes devem ser realizados à temperatura ambiente (18 a 30°C).
- Apesar dos testes poderem ser realizados em placas com cavidades em “U” ou “V”, as características de desempenho para todos os grupos foram confirmados pela Remel utilizando as cavidades em “U”. Se for preferida a cavidade em “V”, recomenda-se a familiarização do utilizador com os padrões de reacção apresentados. Algumas marcas de placas de microtitulação poderão dar origem a resultados inferiores pelo que apenas o tipo de placa recomendado pelo representante local deve ser utilizado.
- As placas com cavidades “UV” não devem ser utilizadas.
- As micropipetas fornecem resultados mais exactos e reproduzíveis que os microdiluidores, devendo por isso ser utilizadas sempre que possível para a titulação das amostras. Se forem utilizados microdiluidores, é necessário certificar que estes comportam volumes exactos.

6. COLHEITA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS

O sangue colhido por punção venosa deve coagular naturalmente e o soro deve ser clarificado através de centrifugação antes da realização do teste. Caso seja necessário armazenar as amostras antes da realização do teste, estas devem ser mantidas congeladas

a uma temperatura entre -15 a -25°C. Evitar múltiplos ciclos de congelação/descongelação. Antes da realização do teste, todas as amostras de soro devem ser inactivadas termicamente a 56°C durante 30 minutos.

Não devem ser utilizadas amostras de plasma.

7. PROCEDIMENTO

MATERIAL FORNECIDO

São fornecidos reagentes suficientes para 50 testes. Consultar a secção **Conteúdo do Kit**.

EQUIPAMENTO NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Para além do material normalmente disponível em laboratório, é necessário:

- Placas de microtitulação com fundo em “U” ou “V” descartáveis ou reutilizáveis.
- Conta-gotas de 0,025 ml.
- Micropipeta de 0,025 ml (multicanal) ou microdiluidores.

NOTAS

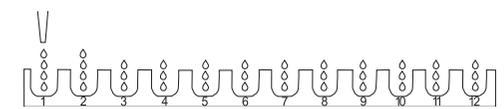
Os conta-gotas e microdiluidores encontram-se disponíveis através da Dynatech Laboratories (armazém Scientific Products nos E.U.A.). As micropipetas encontram-se disponíveis através da Flow Laboratories.

PROCEDIMENTO DE TESTE

Procedimento do Teste Thymune*-M

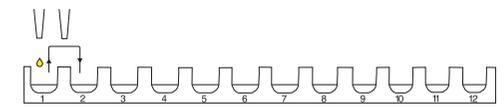
É necessária uma fila completa (cavidades 1-12) da placa de microtitulação por cada amostra ou controlo a testar. Um Controlo Sérico Positivo e um Negativo devem ser incluídos em cada grupo de testes e tratados com o soro de doente. As amostras de soro devem ser inactivadas termicamente a 56°C durante 30 minutos.

Passo 1



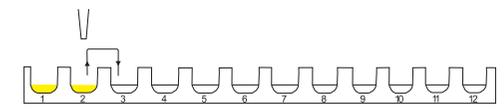
Utilizando um conta-gotas padrão de 0,025 ml, adicionar 4 gotas de diluente  às cavidades 1 e 2, e 3 gotas às cavidades 3-12.

Passo 2



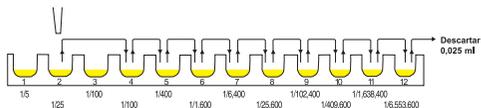
Pipetar 0,025 ml de soro  na cavidade 1. Utilizando uma micropipeta ou microdiluidor, homogeneizar e transferir 0,025 ml para a cavidade 2.

Passo 3



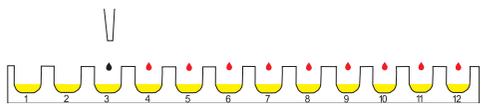
Com uma ponta de micropipeta ou microdiluidor limpo, transferir 0,025 ml da cavidade 2 para a cavidade 3 - esta é a cavidade do controlo sérico. Homogeneizar bem a cavidade 3 e descartar 0,025 ml da cavidade 3.

Passo 4



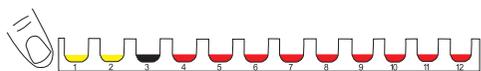
Com uma ponta de micropipeta ou microdiluidor limpo, transferir 0,025 ml da cavidade 2 para a cavidade 4, homogeneizar e transferir 0,025 ml para a cavidade 5. Continuar as diluições quádruplas até à cavidade 12. Descartar 0,025 ml da cavidade 12.

Passo 5



Adicionar imediatamente 0,025 ml de Células de Controlo à cavidade 3 e 0,025 ml de Células de Teste às cavidades 4-12.

Passo 6



Homogeneizar o conteúdo num agitador de placa durante, pelo menos, 30 segundos ou batendo cuidadosamente nos quatro lados da placa.

ATENÇÃO – uma homogeneização inadequada ou uma velocidade demasiado baixa do agitador de placa poderá resultar em padrões enganosos e sensibilidade reduzida.

Tapar a placa com uma tampa, para evitar a evaporação/contaminação. Deixar a placa repousar à temperatura ambiente (18 a 30°C), protegida da incidência directa da luz solar e de quaisquer vibrações. Proceder à leitura dos resultados após uma hora.

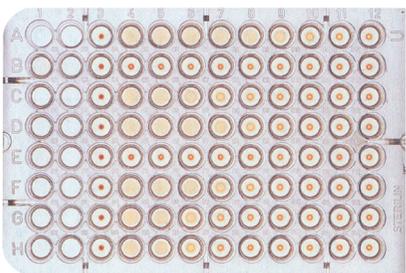
8. RESULTADOS

LEITURA DOS RESULTADOS

Num teste positivo, as células sensibilizadas são aglutinadas pelo anticorpo e depositam-se no fundo da cavidade na forma de um tapete difuso. Num teste negativo, as células depositam-se no fundo da cavidade formando um pequeno círculo ou um botão compacto. As reacções positivas fracas podem resultar em padrões intermédios. O ponto-final deverá ser lido como a diluição mais elevada da amostra que apresente aprox. 50% de aglutinação com as Células de Teste.

Uma “pro-zona” (uma ou mais cavidades que apresentam aglutinação inesperadamente fraca) é por vezes observada com baixas diluições de soros positivos bastante concentrados, pelo que estes resultados não devem ser falsamente interpretados.

Resultados tipicamente obtidos com o Thymune*-M



A imagem mostra oito titulações numa placa de microtitulação de cavidades em “U”. A terceira cavidade de cada fila contém Células de Controlo com uma diluição de 1/100 do soro. As cavidades 4 a 12 contêm Células de Teste e diluições quádruplas do soro (a partir de uma diluição inicial de 1/100).

- Fila A = Positiva 1/102.400 - 1/409.600
- Fila B = Negativa
- Fila C = Positiva 1/1.600 - 1/6.400
- Fila D = Positiva 1/6.400 - 1/25.600
- Fila E = Negativa
- Fila F = Positiva 1/6.400
- Fila G = Positiva 1/1.600
- Fila H = Positiva 1/400 - 1/1.600

CONTROLO DE QUALIDADE

A cavidade de controlo (coluna 3) tem de ser sempre negativa. As reacções heterofílicas contra constituintes de peru são raras nas diluições de 1/100 ou superiores mas, se a cavidade de controlo apresentar aglutinação, a amostra de soro deve ser absorvida misturando as células aglomeradas presentes em 0,5 ml da suspensão de Células de Controlo com 0,1 ml do soro a testar. Agitar a mistura, deixar repousar durante 10 minutos e separar o soro absorvido através de centrifugação. Repetir o teste utilizando o soro absorvido.

Os Controlos Séricos Positivo e Negativo destinam-se a assegurar o funcionamento correcto das suspensões de Células de Teste e de Controlo. O Soro Negativo não deve provocar aglutinação em qualquer das diluições, enquanto que o Soro Positivo deve produzir aglutinação até uma diluição de pelo menos 1/400 com as Células de Teste. As Células de Controlo devem apresentar padrões de não aglutinação na cavidade de controlo. Os títulos observados em placas de cavidades em “V” são, geralmente, um pouco mais elevados (o título pode situar-se entre as diluições quádruplas do protocolo de teste padrão). Se não for demonstrado um título aceitável para o Controlo Sérico Positivo, é porque o teste não tinha a sensibilidade correcta e que deve ser repetido.

INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Os anticorpos detectados pelo teste de hemaglutinação microssomal constituem o principal marcador circulante da doença autoimune da tiróide humana, que inclui perturbações clínicas como a tiroidite com bócio (doença de Hashimoto), a tiroidite atrófica (mixedema) e a tirotoxicose (doença de Graves/ Basedow)³.

A combinação dos testes de hemaglutinação da tiroglobulina e de microssomas irá detectar praticamente todos os casos de bócio de Hashimoto e cerca de 90% dos casos de mixedema primário. Os dois testes devem ser realizados em conjunto em todos os casos de bócio nos quais vai ser realizada a intervenção cirúrgica, uma vez que nem sempre é clinicamente possível distinguir entre a tiroidite auto-imune e outros tipos de bócio. Um outra importante aplicação destes dois testes de anticorpos da tiróide é a diferenciação entre a tirotoxicose primária e taquicardias várias, períodos de ansiedade, perda de peso inexplicável e diarreia. Nos casos de exoftalmia unilateral, os testes ajudarão a distinguir entre a etiologia endócrina e lesões locais das órbitas, evitando testes mais agressivos ou dispendiosos. Cerca de 70-90% dos casos com variantes da doença de Graves apresentaram títulos de hemaglutinação da tiroglobulina e/ou microssoma positivos comparados com 10-15% dos controlos segundo idade e sexo. Apesar da maioria dos indivíduos tirotóxicos apresentar níveis relativamente baixos de anticorpos, cerca de 20% apresentou

títulos moderados a elevados (tiroglobulina $\geq 1/640$, microssoma $\geq 1/6400$), o que indicia ou uma forma mais grave da doença com tendência para a recaída ou uma tiroidite destrutiva concomitante predispondo o mixedema pós-operatório ou para perda espontânea da função tiroidea alguns anos após um episódio tirotóxico. Da mesma forma, a hemaglutinação da tiroglobulina em combinação com a hemaglutinação microssomal irá diferenciar os casos de tiroidite atrófica dos de hipotiroidismo médio a grave e ainda dos casos de depressão ou obesidade provocados por outras causas. Resultados positivos nestes dois testes não são suficientes para excluir a possibilidade de cancro da tiróide, nem os títulos baixos (tiroglobulina $< 1/160$, microssoma $< 1/1600$) indiciam sempre lesões graves da tiróide, uma vez que muitos casos de “tiroidite focal” permanecem na forma sub-clínica e não progridem. Se for obtido um resultado positivo, é necessário proceder à investigação suplementar através de cintigrafia para pesquisar a existência de cancro da tiróide, teste TRH para estimar a autonomia da tiróide ou determinação da TSH sérica para casos suspeitos de hipotiroidismo. A escolha do tipo de teste está dependente das observações clínicas.

Os testes de hemaglutinação da tiroglobulina e microssomal fornecem informações úteis para a previsão de eventuais disfunções da tiróide em doentes com outras perturbações endocrinológicas autoimunes, como por exemplo a doença de Addison, a diabetes mellitus insulina-dependente ou auto-imunopatias poli-endocrinológicas e em membros de famílias com tendência para autoimunidade a órgãos específicos.

9. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Uma grande parte dos soros fortemente positivos apresentam “pro-zonas” neste teste e, por este motivo, é necessário executar a titulação completa em todos os soros.

Não devem ser utilizadas amostras de plasma ou de soro infectado.

10. RESULTADOS ESPERADOS

Consultar a secção **Interpretação dos Resultados.**

11. CARACTERÍSTICAS DO DESEMPENHO

Foi realizada uma comparação entre a sensibilidade do Thymune*-M com a técnica de hemaglutinação com células de ovelha, através da análise de 158 amostras séricas de doentes com bócio de Hashimoto, mixedema primário ou tirotoxicose. Ficou estabelecida uma boa correlação entre os dois sistemas de teste, que variaram por diferentes títulos entre 1/100 e 1/1.600.000. A correlação entre os títulos de hemaglutinação e de anticorpo fluorescente foi também identificada como sendo boa, apresentando uma relação linear entre os títulos de até 1/1.600.000 para o teste de hemaglutinação e de 1/1280 para o de anticorpo fluorescente (FAT)².

Ao testar soros de um painel de dadores de sangue normal, a incidência de resultados positivos foi de 7% com títulos de $\leq 1/1600$ ².

Os reagentes são cuidadosamente controlados para assegurar a reprodutibilidade entre grupos de trabalho. Cada lote de Células de Teste é preparado para alcançar títulos consistentes ao ser testado frente a um painel de soros contendo níveis conhecidos de anticorpos, com uma tolerância não superior a uma diluição dupla. A reprodutibilidade lote-a-lote foi determinada através do teste de 12 amostras em 3 ocasiões utilizando três grupos de reagentes. Cada uma das amostras apresentou sistematicamente resultados dentro do intervalo de mais ou menos uma diluição dupla em todas as ocasiões¹⁰.

12. BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, J.R., Goudie, R.B., et al (1959). The ‘Thyrotoxic’ Complement-Fixation Reaction. *Scot. med. J.* 4, 64.
2. Cayer, I., Chalmers, S.R., et al (1978). An evaluation of two new haemagglutination tests for the rapid diagnosis of autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Path.* 31, 1147.
3. Doniach, D. (1975). Humoral and Genetic Aspects of Thyroid Autoimmunity. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 4, Part 2, p. 267, Irvine, W.J. (ed.).
4. Doniach, D. and Roitt, I.M. (1962). Auto-Antibodies in disease^{1,2}. *Ann. Rev. Med.*, 13, 213.
5. Doniach, D. and Roitt, I.M. (1976). *Clinical aspects of immunology* 3rd edition, ed. P.G.H. Gell, R.R.A. Coombs and P.J. Lachmann, Blackwell, Oxford.
6. Roitt, I.M., Doniach, D., et al (1956). Auto-Antibodies in Hashimoto’s disease (Lymphadenoid Goitre). *Lancet*, ii, 820.
7. Vallée, G., Izembart, M., et al (1982). Étude de la fréquence des anticorps antithyroglubuline et antimicrosomaux en pathologie thyroïdienne. *Ann. Biol. Clin.*, 40, 651-656.
8. Witebsky, E. and Rose, N.R. (1956). Studies on organ specificity. I.V production of Rabbit Thyroid Antibodies in the Rabbit¹. *J. Immunol.*, 76, 408.
9. Witebsky, E., Rose, N.R., et al (1957). Chronic Thyroiditis and Autoimmunization. *J. Amer. med. Ass.*, 164, 1439.
10. **Données sur fichier.**

13. EMBALAGEM

REF AD11/R30850501.....

14. LEGENDA DOS SÍMBOLOS

REF	Número de catálogo
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico in vitro
	Consulte as instruções para utilização
	Limites de temperatura
	Conteúdo suficiente para "n" ensaios
	Atenção
LOT	Código do lote
	Prazo de validade
	Fabricante



IFU X7822A, Revisado Março de 2016



Remel Europe Ltd
Clipper Boulevard West, Crossways
Dartford, Kent, DA2 6PT
UK

Para obter assistência técnica, contacte o seu distribuidor local.