

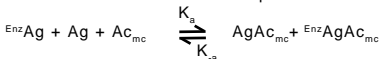
FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de concentração de Triiodotironina, em soro ou plasma humano, por Enzaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

O teste EIA (Enzaimunoensaio) BIOLISA-T3 TOTAL é altamente sensível e requer pouca manipulação técnica. Neste método, primeiro são pipetados nas respectivas microcavidades da placa os padrões de referência, amostras de pacientes e controles. Em seguida, adiciona-se o Conjugado Enzimático de T3 e a reação é homogeneizada. Uma reação competitiva resulta da combinação entre o Conjugado Enzimático e o Triiodotironina nativo (presente na amostra) com o número limitado de anticorpos combinantes imobilizados nas microcavidades da placa. Essa interação é ilustrada pela seguinte equação:



Onde:

Ac_{mc} = Anticorpo mono específico imobilizado na microcavidade (constante)

Ag = Antígeno nativo (variável)

${}^{\text{Enz}}\text{Ag}$ = Conjugado enzimático

AgAc_{mc} = Complexo antígeno-anticorpo

${}^{\text{Enz}}\text{AgAc}_{\text{mc}}$ = Conjugado enzima-antígeno-complexo anticorpo

K_a = razão constante de associação

K_{-a} = razão constante de dissociação

$\text{K} = \text{K}_a / \text{K}_{-a}$ = Equilíbrio constante

Após completado o período de incubação, o anticorpo aderente Conjugado Enzimático-T3 é separado do antígeno não aderente por aspiração ou decantação. A atividade enzimática na superfície da microcavidade é quantificada pela reação de cor, produzida com substrato.

O uso de diversos padrões de referência de concentrações conhecidas de T3 permite a construção de um gráfico de atividade e concentração. A atividade enzimática das amostras desconhecidas (pacientes) é comparada com a curva de calibração, determinando-se a concentração dessas amostras.

REAGENTES

1- Padrões de referência (A-F)

Seis (6) frascos de padrões de referência contendo Triiodotironina, em diferentes concentrações, em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 8°C.

A = 0,0 ng/dL

B = 50,0 ng/dL

C = 100,0 ng/dL

D = 250,0 ng/dL

E = 500,0 ng/dL

F = 750,0 ng/dL

2 - Conjugado enzimático (E)

Triiodotironina de células de cavalo conjugada com peroxidase (HRP) Contém conservante. Estocar entre 2 e 8°C

3-Dilúente para Conjugado Enzimático (B)

Solução dilúente, corante, conservante. Estocar entre 2 e 8°C.

4-Placa revestida de anticorpo (P)

Estocar entre 2 e 8°C.

5 - Solução de lavagem concentrada (L)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica.

Estocar entre 2 e 30°C.

6 - Substrato A (S^A)

Tetrametilbenzidina (TMB). Estocar entre 2 e 8°C.

7 - Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Estocar entre 2 e 8°C.

8 - Solução de parada (P)

Ácido Clorídrico (HCl) 1N. Estocar entre 2 e 30°C.

APRESENTAÇÃO

Apresentação	1	2
REAGENTES	96 microcavidades	192 microcavidades
1 - Padrões de Referência	6 Frascos A-F x 1,0 mL	6 Frascos A-F x 1,0 mL
2 - Conjugado enzimático (E)	1 Frasco x 1,5 mL	2 Frascos x 1,5 mL
3 - Dilúente para Conjugado Enzimático (B)	1 Frasco x 13 mL	2 Frascos x 13 mL
4 - Placa sensibilizada acondicionada em embalagem de alumínio, com sílica (anti-umidade)	1 Unidade x 96 poços	2 Unidades x 96 poços
5 - Solução de Lavagem concentrada	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 20 mL
6 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
7 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
8 - Solução de Parada	1 Frasco x 8 mL	2 Frascos x 8 mL

EQUIPAMENTOS E INSUMOS OPERACIONAIS

Materiais contidos no Kit:

-Reagentes descritos no quadro anterior,

-Instruções de uso (manual).

Materiais necessários, mas não contidos no kit:

- 1) Pipeta(s) com capacidade de dispensar volumes de 50 µl, com precisão maior que 1,5%.
- 2) Repipetador(es) para dispensagens repetitivas de volumes de 100 µl e 300 µl, com precisão maior que 1,5% (opcional) ou pipeta multicanal.
- 3) Lavadora de microplaca (opcional) ou pipetas para lavagem das microcavidades.
- 4) Leitora de ELISA com capacidade de absorvância em 450 / 630 nm de comprimento de onda.
- 5) Pipetas com volumes reguláveis (200 µl a 1000 µl) para diluição do Substrato.
- 6) Tubos de ensaio para a diluição do Substrato A e B.
- 7) Papel absorvente para secar as microcavidades.
- 8) Embalagem plástica ou cobertura de microplaca para os passos de incubação.
- 9) Cronômetro ou relógio.

10) Frasco para estocar a solução de lavagem.

11) Água destilada ou deionizada.

12) Ferramentas de Controle de Qualidade.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E TRANSPORTE

A temperatura de armazenamento deverá ser de 2 a 8°C. O transporte em temperaturas entre 15 e 30°C não deverá exceder a 72 (setenta e duas) horas. Não congelar. Manter ao abrigo da luz e evitar umidade.

CUIDADOS ESPECIAIS

- 1 - Somente para uso diagnóstico *in vitro*;
- 2 - Seguir com rigor a metodologia proposta para a obtenção de resultados exatos;
- 3 - Recolocar as tiras de microcavidades não utilizadas no invólucro de alumínio, vedar e estocar a 2-8°C.
- 4 - A água utilizada na limpeza do material deve ser recente e isenta de contaminantes;
- 5 - Colunas deionizadoras saturadas liberam água alcalina, ions diversos e agentes oxidantes e redutores, que podem alterar de forma significativa os resultados;
- 6 - O descarte do material utilizado deverá ser feito obedecendo-se os critérios de biossegurança de acordo com a legislação vigente.
- 7 - Toda matéria-prima do produto é testado e deve ser não reagente para HBsAg, Anti-HIV 1&2 e Anti-HCV. Entretanto, esses testes não oferecem total segurança da ausência de agentes infecciosos. A manipulação manual de todo produto que contém soro humano é potencialmente capaz de transmitir doenças. Portanto, é preciso tomar os devidos cuidados de biossegurança na manipulação desses produtos.
- 8 - Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.
- 9 - Por medida de proteção, pode-se cobrir a placa durante a reação. Caso opte por este procedimento, é necessário que seja estabelecido como rotina.

AMOSTRAS

Utilizar soro ou plasma (EDTA ou Heparina).

Amostra(s) hemolizadas ou altamente lipêmicas não devem ser usadas.

As amostras podem ser conservadas sob refrigeração, entre 2 e 8°C, pelo período máximo de 5 dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de 5 dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Para amostras que serão testadas em duplicata, o volume requerido é de 0,050 mL de soro diluído.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Reagente de trabalho 1 – Conjugado enzimático de T3 TOTAL:

Diluir o Conjugado enzimático concentrado 1:11 com o dilúente de Conjugado enzimático. Por exemplo: diluir 160 µL do Conjugado com 1,6 mL do dilúente para 16 microcavidades (2 tiras de 8 testes). Este reagente deve ser usado em até 24 horas para a boa performance do teste. Portanto, prepare apenas a quantidade a ser usada. Conservar entre 2 e 8°C (por até 24 horas).

Fórmula geral para o cálculo da quantidade a ser preparada:

Quantidade necessária de dilúente = Número de microcavidades (testes) x 0,1.

Quantidade necessária de Conjugado concentrado = Número de microcavidades (testes) x 0,01

No exemplo acima (16 testes):

Quantidade Dilúente =

16 x 0,1 = 1,6 mL de dilúente de Conjugado

Quantidade Conjugado = 16 x 0,01 = 0,16 mL (160 µl) de Conjugado enzimático de T4 concentrado.

1) Solução de lavagem:

Diluir o conteúdo do frasco n° 5 (Solução de Lavagem Concentrada (L)) em 1000 mL de água destilada ou deionizada. Estocar em temperatura ambiente até a validade impressa no frasco original.

2) Substrato – Solução de trabalho

Determinar a quantidade necessária de cavidades a serem utilizadas para preparo de uma quantidade adequada. Preparar a solução misturando partes iguais de Substrato A e Substrato B.

Para cada microcavidade (teste):

50 µl de Substrato A + 50 µl de Substrato B

Por exemplo: misture 1 mL de Substrato A e 1 mL de Substrato B para duas tiras de 8 microcavidades (16 testes).

PREPARAR IMEDIATAMENTE ANTES DO USO.

Usar no máximo, até uma (1) hora após preparo.

TÉCNICA

Antes de começar o ensaio, colocar todos os reagentes, amostras, soros de referência (padrões) e controles para estabilizarem em temperatura ambiente (15 - 30°C).

- 1) Separar as microcavidades a serem utilizadas considerando: Padrões, controles e amostras (podendo ser testados em duplicata.)
- 2) Pipetar 0,050 mL (50 µl) dos padrões, controles e amostras em suas respectivas microcavidades.
- 3) Pipetar 0,100 mL (100 µl) do reagente de trabalho 1 (Conjugado enzimático de T3 TOTAL) (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO). Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos e (cobrir a placa. (opcional).
- 4) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.
- 5) Descartar o conteúdo das microcavidades por aspiração (Lavadora), ou decantação;
- 6) Pipetar aproximadamente 300 µl de solução de lavagem previamente preparada em todas as microcavidades. (Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 7) Decantar ou aspirar (lavadora), para um total de cinco (5) Ciclos de lavagens. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.
- 8) Pipetar 0,100 mL (100 µl) do Substrato previamente preparado em todas as microcavidades. (VIDE PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 9) Incubar por quinze (15) minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
- 10) Pipetar 0,050 mL (50 µl) de solução de parada em todas as microcavidades. Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.
- 11) Ler a absorvância de cada microcavidade em 450/630 nm em uma leitora de ELISA. Os resultados podem ser lidos em até trinta (30) minutos após a adição da solução de parada.

DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

Uma curva de calibração é usada para determinar a concentração de T3 TOTAL em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da Curva de Calibração

Registrar as absorvâncias obtidas na Leitora de ELISA, como apresentado no exemplo 1. Plotar as absorvâncias de cada padrão de referência versus a concentração correspondente de T3 TOTAL em papel de gráfico linear (não calcule as médias das duplicatas antes de plotá-las no gráfico). Traçar a curva.

Os dados apresentados no exemplo 1 são apenas para ilustração e não podem ser usados em substituição à curva de calibração, que deve ser construída em cada ensaio.

Exemplo 1

Padrões	Microcavidade	Abs. (60 min.)
A (0 ng/dL)	1	2,604
	2	2,507
B (50 ng/dL)	3	2,073
	4	2,128
C (100 ng/dL)	5	1,678
	6	1,646
D (250 ng/dL)	7	0,964
	8	0,969
E (500 ng/dL)	9	0,55
	10	0,551
F (750 ng/dL)	11	0,372
	12	0,369

Concentração de T3 Total (ng/dL)

LIMITAÇÃO DO PROCESSO

a) Performance do ensaio

Os padrões de referência e controles podem ficar turvos com o tempo. Isso não afeta a performance do teste. Use até o término ou até a data de validade.

É muito importante que o tempo de reação de cada microcavidade seja constante para a boa reprodutibilidade dos resultados. A pipetagem das amostras não pode se estender por mais de dez (10) minutos para evitar desvios no ensaio. Se for usada mais que uma (1) placa, é recomendável repetir a curva.

A adição do Substrato inicia a reação cinética, que é encerrada pela adição da solução de parada. Logo, a adição do Substrato e da solução de parada deve ocorrer na mesma sequência para eliminar desvios de tempo durante a reação.

Leitoras de ELISA lêem na vertical. Não toque o fundo das microcavidades.

Falhas no processo de lavagem podem resultar em resultados imprecisos ou incorretos.

Cada reagente de um ensaio deve ser do mesmo lote e estocado em condições idênticas.

b) Interpretação

Se for usado um programa para interpretar os resultados, é imprescindível que se estabeleça uma margem de erro de 10% para os resultados dos calibradores e amostras.

A concentração sérica de T3 Total depende de múltiplos fatores funcionamento da glândula da tireóide, concentração de globulinas ligadas à tiroxina (TBG) e outros fatores vinculados à Triiodotironina. A concentração sérica de T3 Total não constitui, isoladamente, parâmetro para diagnóstico clínico.

O decréscimo nos valores de T3 Total estão relacionados a deficiência protéicas, doenças do fígado e administração de Testosterona, difenilidantoina ou salicilatos. A tabela de drogas interferentes e condições que afetam os valores de Triiodotironina foram compiladas no "Journal of the American Association of Clinical Chemists".

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada Laboratório deve estabelecer valores de referência para níveis de T3 em hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo e monitorar a performance dos ensaios.

PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE:

Absorbância máxima (calibrador 0 ng/dL) = > 1,5 a 2,75

VALORES DE REFERÊNCIA

Método paramétrico: ng/mL ou ng/dL
Variação normal 0,52 -1,85 52 - 185

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O BIOLISA-T3 total foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 07 amostras de população hipotireóide, eutireóide e hipertireóide (27,7 a 279 ng/dL).

A equação de regressão linear obtida foi $y = 1,0977x - 5,8757$ e o coeficiente de correlação igual = 0,9956.

Com estes resultados pode-se concluir que o kit apresenta boa especificidade metodológica.

Precisão

REPETIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens consecutivas com 3 amostras, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (ng/dL)	29,94	70,63	250,55
Desvio Padrão (ng/dL)	1,34	2,84	10,62
Coefficiente de Variação (%)	4,47	4,03	4,24

REPRODUTIBILIDADE

Foram realizadas 20 dosagens sucessivas com três amostras, durante 3 dias consecutivos, obtendo-se os seguintes resultados:

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3
Concentração (ng/dL)	30,84	70,31	255,37
Desvio Padrão (ng/dL)	0,78	0,73	7,58
Coefficiente de Variação (%)	2,53	1,04	2,97

Sensibilidade

A sensibilidade do Kit BIOLISA-T3 total é de 4 ng/dL de Triiodotironina.

Linearidade

A reação é linear até a concentração do ponto mais alto da curva de calibração. Para amostras com valores superiores, diluir a mesma com Cloreto de Sódio 0,85%, repetir a dosagem e multiplicar o resultado obtido pelo fator de diluição.

Especificidade

As reações cruzadas de Triiodotironina com determinadas substâncias, foram avaliadas com adição de interferentes em um soro-padrão, em várias concentrações. As reações cruzadas foram calculadas pela razão entre uma dosagem de substância interferente e a dosagem de T3 TOTAL necessária para produzir a mesma absorbância.

Substância	Reações Cruzadas	Concentração
L-Triiodotironina	1,0000	---
L-Tiroxina	< 0,0002	10 µg/mL
Iodotirosina	< 0,0001	10 µg/mL
Diiodotirosina	< 0,0001	10 µg/mL
Diodotironina	< 0,0001	10 µg/mL
Fenilbutazona	< 0,0001	10 µg/mL
Salicilato de Sódio	< 0,0001	10 µg/mL

SIGNIFICADO CLÍNICO

A quantificação da concentração sérica de T3 é geralmente usada como ferramenta valiosa no diagnóstico de disfunções da tireóide. Essa importância impulsionou grandes avanços tecnológicos nas metodologias de ensaio, nas últimas duas décadas. O advento do antisoro monoespecífico e a descoberta de agentes bloqueadores do T3 nas proteínas do soro permitiram o desenvolvimento de procedimentos de Radioimunoensaio.

NÚMERO DE TESTES

Apresentação 1 – 96 testes

Apresentação 2 – 192 testes

Referências :

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine."
2. Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948)
3. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Triiodothyronine."
4. Journal Clinical Endocrinol., 33,865 (1971)
5. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U. "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests."
6. Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975)
7. Sterling, L., Diagnosis and treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975).

GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para consumo, todos os reagentes **Bioclin** são testados pelo Departamento de Controle de Qualidade. A qualidade dos reagentes é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

DADOS DO FABRICANTE

QUIBASA QUÍMICA BÁSICA Ltda
Rua Teles de Menezes, 92 - Santa Branca
CEP 31565-130 - Belo Horizonte - MG - Brasil
Tel.: (31) 3439.5454 - Fax (31) 3439.5455
e-mail bioclin@bioclin.com.br
CNPJ: 19.400.787/0001-07 - Indústria Brasileira

ATENDIMENTO AO CONSUMIDOR

Serviço de Assessoria ao Cliente Tel.: 0800 0315454.
e-mail: sac@bioclin.com.br

ANVISA: 10269360168

Revisão: Abril/09