

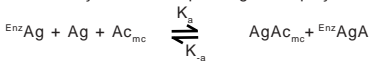
FINALIDADE

Teste para determinação quantitativa de concentração de T4 LIVRE, em soro humano, por Enzaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico in vitro.

PRINCÍPIO DE AÇÃO

O teste BIOLISA-T4 LIVRE 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 T4 (método análogo ao do T4 Total) e a reação é homogeneizada. Uma reação competitiva resulta da combinação entre o Conjugado Enzimático e o Tiroxina Livre, 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_{s} = razão constante de associação

K_{a} = razão constante de dissociação

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

Após completado o período de incubação, o anticorpo aderente Conjugado Enzimático-T4 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 T4 Livre permite a construção de um gráfico de atividade e concentração. A atividade enzimática das amostras desconhecidas (pacientes) é comparada com a curva-padrão, determinando-se a concentração dessas amostras através da correlação das mesmas com a curva-padrão.

REAGENTES

1- Padrões de referência (A-F)

Seis (6) frascos (A-F) de Padrões de referência contendo Tiroxina Livre 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 = 0,4 ng/dL

C = 1,1 ng/dL

D = 2,1 ng/dL

E = 4,2 ng/dL

F = 7,4 ng/dL

Níveis exatos de lotes específicos são dados nos rótulos. Consultar os frascos de padrões do kit em uso e considerar os valores dos mesmos.

2 - Conjugado enzimático (E)

Tiroxina conjugada com enzima peroxidase (HRP).

Contém azida sódica. Estocar entre 2 e 8°C

3 - Placa revestida de anticorpo (P)

Estocar entre 2 e 8°C.

4 - Solução de lavagem concentrada (L)

Solução de fosfato salina pH 7,4 e azida sódica. Estocar entre 2 e 30°C.

5 - Substrato A (S^A)

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

6 - Substrato B (S^B)

Solução de Peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Estocar entre 2 e 8°C.

7 - 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 13 mL	2 Frascos x 13 mL
3 - Placa revestida de anticorpo	1 Unidade x 96 poços	2 Unidades x 96 poços
4 - Solução de lavagem concentrada	1 Frasco x 20 mL	1 Frasco x 20 mL
5 - Substrato A	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
6 - Substrato B	1 Frasco x 7 mL	2 Frascos x 7 mL
7 - 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) Repetidor(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, íons 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

As precauções e tipos usuais de punção venosa devem ser observadas na coleta das amostras. Para melhor parâmetro de comparação com valores normais, colher a amostra à primeira hora da manhã. Colher em tubo sem aditivos. Separar as células vermelhas por centrifugação e usar o soro obtido para o ensaio de T4 LIVRE.

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 cinco (5) dias. Se as amostras não puderem ser analisadas dentro de cinco dias, podem ser estocadas por até 30 dias a temperatura de -20°C (freezer). Se o ensaio for feito em duplicata, o volume necessário de amostra é de 0,100 mL.

DESCRIÇÃO DO PROCESSO

PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO

1) Solução de lavagem: (L)

Diluir o conteúdo do frasco nº 4 (Solução de Lavagem Concentrada 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, padrões de referência e controles 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 Conjugado enzimático em todas as microcavidades.
- 4) Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos.
- 5) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.
- 6) Descartar o conteúdo das microcavidades por aspiração (Lavadora), ou decantação;
- 7) Pipetar aproximadamente 300 µL de solução de lavagem **previamente preparada** em todas as microcavidades.
(Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 8) Decantar ou aspirar (lavadora), para um total de cinco (5) Ciclos de lavagens. Para a garantia da secagem da placa, bater em papel absorvente.
- 9) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Substrato **previamente preparado** em todas as microcavidades.
(Vide PREPARO DOS REAGENTES DE TRABALHO).
- 10) Incubar por quinze (15) minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
- 11) Pipetar 0,050 mL (50 µL) de solução de parada em todas as microcavidades.
Homogeneizar gentilmente por 15 a 20 segundos.
- 12) 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 Tiroxina Livre em amostras desconhecidas (pacientes).

Preparo da curva de calibração

Registrar as absorvâncias obtidas na Leitora de microplaca, como apresentado no exemplo 1.

Plotar as absorvâncias de cada soro de referência (padrão) versus a concentração correspondente de T4 Livre em ng/dl em papel de gráfico linear (não calcule as médias das duplicatas antes de plotá-las no gráfico).

Traçar a curva.

Padrões	Microcavidade	Abs. (60 min.)
A (0,0 ng/dL)	1	2,462
	2	2,531
B (0,4 ng/dL)	3	2,330
	4	2,255
C (1,1 ng/dL)	5	1,915
	6	1,892
D (2,1 ng/dL)	7	1,328
	8	1,262
E (4,2 ng/dL)	9	0,834
	10	0,804
F (7,4 ng/dL)	11	0,399
	12	0,421

Substância	Reações Cruzadas	Concentração
L-Tiroxina	1,0000	---
D-Tiroxina	0,9800	10 µg/dL
D-Triiodotironina	0,0150	100 µg/dL
L-Triiodotironina	0,0300	100 µg/dL
Iodotirosina	0,0001	100 µg/dL
Diiodotirosina	0,0001	100 µg/dL
Diiodotironina	0,0001	100 µg/dL

Concentração de T4 Livre (ng/dL)

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

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 seqüência 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.

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 Tiroxina, principal hormônio da tireóide, circula na corrente sanguínea transportado por proteínas. O veículo transportador é o TBG. Apenas a porção livre da Tiroxina (não transportada por TBG) é responsável pela ação biológica.

CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada Laboratório deve estabelecer valores de referência para níveis de T4 Livre 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 2,7

VALORES DE REFERÊNCIA

Valores normais para o KIT BIOLISA-T4 LIVRE em ng/dL

	Adultos	Gestantes
Varição normal	0,8 a 2 ng/dL	0,8 a 2,2 ng/dL

DESEMPENHO DO PRODUTO

Exatidão

COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O BIOLISA-T4 LIVRE foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 07 amostras de população hipotireóide, eutireóide e hipertireóide (0,36 a 6,4 ng/dL). A equação de regressão linear obtida foi $y = 0,8993x + 0,1528$ e o coeficiente de correlação igual a 0,9995. 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)	1,74	5,53	0,40
Desvio Padrão (ng/dL)	0,08	0,26	0,02
Coefficiente de Variação (%)	4,74	4,73	4,88

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)	1,84	5,82	0,40
Desvio Padrão (ng/dL)	0,09	0,26	0,01
Coefficiente de Variação (%)	4,83	4,39	2,50

Sensibilidade

A sensibilidade do Kit BIOLISA-T4 LIVRE é 0,05 ng/dL. A sensibilidade foi estabelecida pelo determinante de variabilidade do padrão de 0 ng/dL.

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 Anti-Tiroxina com determinadas substâncias, foram avaliadas com adição de interferentes em um padrão, em várias concentrações. As reações cruzadas foram calculadas pela razão entre uma dosagem de substância interferente e dosagem de tiroxina necessária para substituir a mesma quantidade do marcador.

SIGNIFICADO CLÍNICO

As concentrações das proteínas transportadas (TBG) são alteradas em diversas situações clínicas, como, por exemplo, na gestação. Numa tireóide de função normal, se as proteínas transportadoras (TBG) se alteram, os níveis de T4 Total também mudam, mas a porção livre permanece constante. Portanto, a quantificação da concentração do T4 Livre constitui parâmetro melhor que o T4 Total para a determinação de quadro clínico.

Por exemplo, o aumento dos níveis de T4 Total estão associados a estados de gestação, uso de contraceptivos orais e tratamentos com estrógenos, resultando em níveis de T4 Total acima do limite de normalidade, enquanto que a concentração de T4 Livre permanece dentro da faixa de normalidade. Alterações nos níveis de TBG podem levar a diagnósticos equivocados de Hiper e Hipotireoidismo, se for considerada apenas a concentração de T4 Total. Ressaltando, o T4 Livre, normalmente, revela o quadro clínico atual do paciente.

NÚMERO DE TESTES

96 / 192 TESTES

Referências :

- 1) Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine." Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948)
- 2) Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine." Journal Clinical Endocrinol., 33,865 (1971)
- 3) Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U. "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests." Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975)
- 4) 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: 10269360164

Revisão: Abril/09