

# Bioclin

## BIOLISA T4 TOTAL

### K098

#### INSTRUÇÕES DE USO

##### FINALIDADE

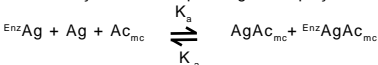
Teste para determinação quantitativa de concentração de T4 TOTAL, em soro ou plasma humano, por Enzimaimunoensaio, em microplaca. Somente para uso diagnóstico *in vitro*.

##### PRINCÍPIO DE AÇÃO

Metodologia: Enzimaimunoensaio ou imunoenzimétrica.

O teste EIA (Enzimaimunoensaio) BIOLISA T4 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 e a reação é homogeneizada. Uma reação competitiva resulta da combinação entre o Conjugado e a Tiroxina nativo (presente na amostra) com o número limitado de anticorpos combinantes imobilizados nas microcavidades da placa.

Essa interação é ilustrada pela seguinte equação:



##### Onde:

$\text{Ac}_{\text{mc}}$  = Anticorpo monoespecífico imobilizado na microcavidade (constante)

$\text{Ag}$  = Antígeno nativo (variável)

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

$\text{AgAc}_{\text{mc}}$  = Complexo antígeno-anticorpo

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

$\text{K}_{\text{s}}$  = razão constante de associação

$\text{K}_{\text{a}}$  = 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 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 Tiroxina 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.

#### REAGENTES

##### 1) Padrões referência (A – F)

Seis (6) frascos de Padrões referência contendo Tiroxina em diferentes concentrações em solução de tampão pH 7,4 e azida sódica.:

Estocar entre 2 e 8°C.

A= 0,0 µg/dL

B= 2,0 µg/dL

C= 5,0 µg/dL

D=10,0 µg/dL

E=15,0 µg/dL

F=25,0 µg/dL

##### 2) Conjugado Concentrado ( E )

Tiroxina de células de cavalo conjugadas com peroxidase (HRP) em albumina estabilizada. Contém conservante. Estocar entre 2 e 8°C

##### 3) Diluente de Conjugado ( B )

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

##### 4) Placa Sensibilizada ( )

Estocar entre 2 e 8°C.

##### 5 - Lavagem concentrada ( )

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

##### 6 - Substrato A ( S<sup>A</sup> )

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

##### 7 - Substrato B ( S<sup>B</sup> )

Solução de Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Estocar entre 2 e 8°C.

##### 8 - Solução de parada ( )

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

#### APRESENTAÇÃO

Apresentação	1	2
REAGENTES	96 microcavidades	192 microcavidades
1 - Padrões Referência	6 Frascos A-F x 1,0 mL	6 Frascos A-F x 1,0 mL
2 - Conjugado Concentrado	1 Frasco x 1,5 mL	2 Frascos x 1,5 mL
3 - Diluente de Conjugado	1 Frasco x 13 mL	2 Frascos x 13 mL
4 - Placa sensibilizada	1 Unidade x 96 poços	2 Unidades x 96 poços
5 - 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 25 e 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.

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 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).

Amostrat(s) hemolisadas ou altamente lipêmicasas 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 T4:

Diluir o Conjugado enzimático concentrado 1:11 com o diluente de Conjugado enzimático.

Exemplo: Diluir 160 µL do Conjugado

1,6 mL do diluente para 16 microcavidades

(2 tiras de 8 testes). Este reagente deve ser usado em até 24 horas. Para uma boa performance do teste, prepare apenas a quantidade a ser usada. Conservar entre 2 e 8°C.

##### Fórmula geral para o cálculo da quantidade a ser preparada:

Quantidade necessária de diluente = 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 Diluente = 16 x 0,1 = 1,6 mL de diluente de Conjugado

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

##### 2) Solução de lavagem:

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

##### 3) 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 0,025 mL (25 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 T4 diluído – ver seção de preparo dos reagentes) em todas as microcavidades.

4) Homogeneizar gentilmente por 20 a 30 segundos e cobrir a placa.

5) Incubar por 60 minutos em temperatura ambiente.

6) Descartar o conteúdo das microcavidades por decantação ou aspiração. Se for por decantação, secar a placa, batendo em papel absorvente.

7) Pipetar 300 µL de solução de lavagem previamente preparada (ver seção de preparação dos reagentes) em todas as microcavidades, decantar ou aspirar. Repetir mais quatro vezes esse passo, para um total de cinco (5) lavagens.

8) Pipetar 0,100 mL (100 µL) do Substrato –solução de trabalho ( ver seção de preparo dos reagentes) em todas as microcavidades. Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

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. Pipetar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar a diferença de tempo de reação entre as microcavidades.

11) Ler a absorvância de cada microcavidade em 450 nm em uma leitora de placa. Os resultados podem ser lidos em **até** trinta (30) minutos após a adição da solução de parada.

**Obs.:** Para valores superiores a 25 µg/dL, diluir a amostra 1:2 com o padrão de referência de valor 0 (ZERO) e repetir a técnica. Multiplicar o resultado encontrado por 2.

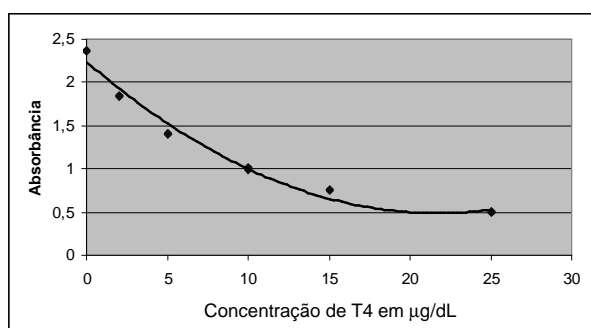
## DESCRIÇÃO DOS CÁLCULOS

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

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 em µg/dL em papel de gráfico linear (não calcule as medidas das duplicatas antes de plotá-las no gráfico). Traçar a curva.

### Exemplo 1

Padrões	Microcavidades	Abs. (60 min.)
A (0,0 µg/dL)	1	2,372
	2	2,354
B (2,0 µg/dL)	3	1,843
	4	1,857
C (5,0 µg/dL)	5	1,409
	6	1,403
D (10,0 µg/dL)	7	0,992
	8	1,012
E (15,0 µg/dL)	9	0,757
	10	0,751
F (25,0 µg/dL)	11	0,494
	12	0,502



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 soros de referência (padrões) 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 placa 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 concentração sérica de T4 Total depende de múltiplos fatores: funcionamento da glândula da tireóide, concentração de globulinas ligadas à tiroxina (TBG) e outros fatores vinculados à Tiroxina. A concentração sérica de T4 Total não constitui, isoladamente, parâmetro para diagnóstico clínico.

Os valores de T4 podem se elevar sob certas condições, como durante a gestação e administração de contraceptivos. Um teste de T3 Uptake pode ser feito para estimar a concentração de TBG e identificar valores de T4 alterados por variação de TBG.

O decréscimo nos valores de T4 Total estão relacionados a deficiência proteicas, doenças do fígado e administração de Testosterona, diphenylhydantoin ou salicilatos. A tabela de drogas interferentes e condições que afetam os valores de Tiroxina foram compilados no "Journal of the American Association of Clinical Chemists".

## NÃO USAR PARA TRIAGEM EM RECÉM-NASCIDOS

## CONTROLE INTERNO DE QUALIDADE

Cada Laboratório deve estabelecer valores de referência para níveis de T4 em hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo e monitorar a performance dos ensaios.

## PARÂMETRO DE CONTROLE DE QUALIDADE

Absorbância máxima (calibrador 0 µg/dL) = > 1,5 a 2,7

## VALORES DE REFERENCIA

1 a 5 anos 7,3 – 15,1 µg/dL  
5 a 10 anos 6,4 – 13,6 µg/dL  
10 a 15 anos 5,5 – 11,5 µg/dL  
> 15 anos 5,2 – 12,4 µg/dL

## DESEMPENHO DO PRODUTO

### Exatidão

### COMPARAÇÃO DE MÉTODOS E ESPECIFICIDADE METODOLÓGICA

O Biolisa T4 Total foi comparado com outro método ELISA disponível comercialmente.

Foram utilizadas 07 amostras de população hipotireóide, eutireóide e hipertireóide (2,02 a 32,8 µg/dL). A equação de regressão linear obtida foi  $y = 1,0372x - 0,4085$  e o coeficiente de correlação igual a 0,992. 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 (µg/dL)	2,23	7,09	30,19
Desvio Padrão (µg/dL)	0,11	0,28	1,47
Coefficiente de Variação (%)	4,99	3,93	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 (µg/dL)	2,26	7,08	30,33
Desvio Padrão (µg/dL)	0,07	0,13	0,50
Coefficiente de Variação (%)	3,10	1,77	1,63

### Sensibilidade

A sensibilidade do Kit Biolisa T4 Total é de 100 pg. Isso equivale a uma amostra com concentração de 0,4 µg/dL de Tiroxina. A sensibilidade foi estabelecida pelo determinante de variabilidade do padrão de 0 µg/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 soro-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.

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

## SIGNIFICADO CLÍNICO

A quantificação da concentração sérica de Tiroxina (T4) é um teste diagnóstico *in vitro* importante na avaliação clínica da função tireoidiana. Essa importância impulsionou significativos avanços tecnológicos nas metodologias de ensaio para T4, nas últimas três décadas. A linha dessa evolução pode ser traçada do teste de proteína ligada com biodina até o teoricamente sofisticado radioimunoensaio.

## 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

Número de registro do Kit de Biolisa T4 TOTAL na ANVISA: 10269360165

Revisão: Jun/11