

INSTRUÇÕES DE USO – T4 TOTAL

T4 EIA MBILOG

Teste imunoenzimático (ELISA) para determinação quantitativa da concentração de Tiroxina total (tT4) em soro humano

Teste para 96 determinações

SUMÁRIO

A Tiroxina (T4) é o principal hormônio tireoidiano, e circula na corrente sanguínea essencialmente na forma complexada a proteínas carreadoras. Contudo, somente a porção livre (não-ligada) de T4 é responsável pela ação biológica.

A principal proteína transportadora é a globulina ligadora de tiroxina (TBG). As concentrações plasmáticas de proteínas carreadoras, especialmente da TBG, são alteradas em muitas condições fisiológicas ou patológicas. Durante o funcionamento normal da tireóide, assim que a concentração de TBG se altera, o nível total de T4 (tT4) também se altera, de modo que a concentração de T4 livre (fT4) permaneça constante.

Conseqüentemente, a concentração de T4 livre se correlaciona melhor com o estado tireoidiano do que o nível de T4 total. Por outro lado, condições que influenciam na concentração das proteínas carreadoras, como a gravidez, o uso de contraceptivos orais e a terapia com estrógeno, podem acarretar em níveis aumentados do hormônio total, enquanto a concentração de fT4 permanece basicamente inalterada.

A metodologia de imunoensaio enzimático (ELISA) fornece ótima sensibilidade e requer poucas manipulações, em uma determinação direta de T4 total.

PRINCÍPIO

Neste método por competição, os soros-padrão e as amostras de soro em análise são adicionados aos respectivos pocinhos da microplaca, que foram previamente recobertos com anticorpos anti-T4. O conjugado T4-peroxidase é adicionado e os reagentes são misturados. Ocorre então, entre o conjugado enzimático e a T4 total, uma reação de competição pela ligação aos sítios dos anticorpos imobilizados. Após a etapa de incubação, o excesso de reagentes não complexados é eliminado na lavagem, e o substrato enzimático é adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul, que é transformada em amarela com a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é indiretamente proporcional à quantidade de tT4 existente. Através da construção da curva-padrão, é possível determinar quantitativamente a concentração de T4 total nas amostras.

Tempo total de incubação: 1 hora e 15 minutos.

COMPONENTES DO KIT

- ◆ Material suficiente para 96 determinações
- 1. **MICROPLACA:** 12 tiras de 8 pocinhos cada, marcados com anticorpos anti-tiroxina, dispostas em suporte
Pronta para uso
- 2. **PADRÕES DA CURVA:** soro humano diluído em tampão com conservante, contendo tiroxina livre nas concentrações aproximadas (os valores exatos são indicados nos rótulos do lote específico):
PADRÃO A: 0 µg/dL, 0,5 mL
PADRÃO B: 2,0 µg/dL, 0,5 mL
PADRÃO C: 5,0 µg/dL, 0,5 mL
PADRÃO D: 10,0 µg/dL, 0,5 mL
PADRÃO E: 15,0 µg/dL, 0,5 mL
PADRÃO F: 25,0 µg/dL, 0,5 mL
Prontos para uso
- 3. **CONJUGADO:** 1,3 mL, tiroxina conjugada a peroxidase, em solução tampão com estabilizantes e conservantes
Concentrado
- 4. **DILUENTE DO CONJUGADO:** 13 mL, solução protéica tamponada com conservantes e corante vermelho.
Pronto para uso
- 5. **SOLUÇÃO DE LAVAGEM:** 20 mL, solução tampão com conservantes
Concentrada 50x
- 6. **SUBSTRATO:** 13 mL, 3,3',5,5'-tetra-metil-benzidina (TMB) em solução tampão
Pronto para uso
- 7. **SOLUÇÃO DE PARADA:** 8 mL, ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,5 M
Pronta para uso
- 8. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades
- 9. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

ARMAZENAMENTO

- Armazenar o kit entre +2 e +8° C.
- As tiras da microplaca não utilizadas devem ser protegidas da umidade, mantidas na embalagem original selada, com o dessecante.
- Os reagentes são estáveis até o prazo de validade do kit, se conservados adequadamente.
- Após abertos, todos os componentes do kit são estáveis por 60 dias, se conservados entre +2 e +8° C.
- Não expor os reagentes à luz solar ou luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o substrato sempre ao abrigo da luz.

MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO INCLUÍDOS NO KIT

- Água deionizada
- Micropipetas e ponteiros descartáveis
- Agitador tipo vórtex
- Papel absorvente
- Cronômetro
- Sistema de lavagem manual ou automático com capacidade para 300 µL
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, 620-630 nm

PRECAUÇÕES DE USO

Somente para o uso em diagnóstico *in vitro*

MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os controles, contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg, bem como para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus do HIV e da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estão sendo manuseados.
- Evitar o contato do substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas, usando recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue sem aditivos ou barreira de gel. Após a coagulação, processá-las imediatamente para obtenção de soros sem hemólise.
- Evitar o uso de soros hemolisados, ictericos ou lipêmicos.
- As amostras devem ser refrigeradas de +2 a +8° C por no máximo 48 horas, ou congeladas a -20° C por até 30 dias. Evitar congelar e descongelar mais de uma vez.

PROCEDIMENTO

Operações prévias

1. Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit, controles e amostras à temperatura ambiente (+20 a +27° C), e homogeneizar suavemente.
2. **Solução de lavagem diluída:** diluir 1 parte da solução concentrada (50x) para 49 partes (1:50) de água deionizada (exemplo: 10 mL + 490 mL), e estocar em frasco adequado.
A solução concentrada permite a preparação de um volume total de 1000 mL (1 litro) de *solução de lavagem diluída*. Cristais na solução concentrada desaparecerão após aquecimento em banho-maria a 37° C.
Armazenar a solução diluída entre 20 a 27°C. A solução diluída é estável por até 60 dias.
3. **Solução de uso do conjugado:** diluir o conjugado concentrado na proporção de 1:11, usando o diluente do conjugado (exemplo: 160 µL + 1,6 mL).

Preparar somente a quantidade a ser utilizada, pois a solução não é estável. Armazenar de +2 a +8°C e utilizar em até 24 hs. Agitar em vórtex antes do uso.

4. Deixar que a microplaca atinja a temperatura ambiente antes de abrir a embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, retornando as restantes para a embalagem com dessecante e selando. Reservar dois pocinhos (duplicatas) para cada padrão, controles internos do laboratório e amostras.
Exemplo: pocinhos A1 e A2 para o *padrão A*, B1 e B2 para o *padrão B*, C1 e C2 para o *padrão C*, D1 e D2 para o *padrão D*, E1 e E2 para o *padrão E*, F1 e F2 para o *padrão F*, G1 e G2 para o controle "X", etc.

Realização do teste

1. Dispensar 25 µL dos padrões, controles internos do laboratório e amostras nos respectivos pocinhos (em duplicata).
2. Adicionar 100 µL da solução de uso do conjugado a cada pocinho.
3. Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos, para homogeneizar. Cobrir com a folha adesiva e incubar por 1 hora à temperatura ambiente (+20 a +27°C).
4. Descartar o conteúdo de todos os pocinhos por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL da solução de lavagem diluída, aspirar ou decantar, e repetir o processo mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente, para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante, batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
5. Dispensar 100 µL do substrato em cada pocinho. Dispensar os reagentes sempre na mesma ordem para minimizar os efeitos de tempo de reação entre os poços.
6. Incubar por exatamente 15 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
7. Adicionar 50 µL da solução de parada a cada pocinho, na mesma ordem usada anteriormente. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos, para homogeneizar.
8. Ler a absorbância a 450 nm, dentro de máximo 30 minutos. Usar a absorbância de 620-630 nm para minimizar as imperfeições da placa.

Nota

Para repetir o teste de amostras com concentração acima de 25 µg/dL:

1. Diluir a amostra de soro, pipetando 12,5 µL do soro e 12,5 µL do padrão A (0 ng/mL) nos pocinhos em duplicata.
2. Proceder ao ensaio como descrito.
3. Multiplicar o valor da absorbância lida por 2.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Os valores de absorbância são inversamente proporcionais à concentração de tT4, visto que o ensaio baseia-se no princípio da competição. Através da construção de uma curva dose-resposta usando os padrões fornecidos no kit (**curva-padrão**), é possível calcular a concentração de tiroxina nas amostras testadas. Isso pode ser feito com auxílio de qualquer programa de computador que faça gráficos, ou à mão, em papel milimetrado.

1. Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada pocinho correspondente aos padrões, controles ou amostras. Calcular a **absorbância média** das duplicatas: $(Abs_1 + Abs_2) / 2$.
2. Para construir a **curva-padrão**, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos padrões, não o valor médio das duplicatas. Plotar em um gráfico a **absorbância** das duplicatas dos padrões (eixo Y vertical) em função da **concentração** de T4 total em µg/dL correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a **curva-padrão**.
3. Determinar a concentração de tT4 (em µg/dL) para cada controle ou amostra, projetando a **absorbância média** das duplicatas sobre a curva-padrão.

CONTROLE DE QUALIDADE

- O teste executado é considerado **válido** observando-se os seguintes critérios:
 - ◆ a absorbância do **padrão A** (0 µg/dL) deve ser **maior ou igual a 1,3**
 - ◆ quatro de cada 6 controles internos devem apresentar valores dentro dos limites esperados
- A cada ensaio, é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo. Para monitorar a performance do teste, é aconselhável incluir controles internos correspondentes aos valores limites de hipotireoidismo, eutiroidismo e hipertireoidismo. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter registros de Controle de Qualidade, para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou degradação dos reagentes do kit. Reagentes frescos devem ser usados para determinar a razão das variações.

LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Performance do ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados errôneos, portanto, não devem ser utilizadas. As soluções do kit devem estar límpidas, livres de contaminação microbiológica, e dentro do prazo de validade. Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes. Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções dadas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações. A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder 10 min, e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma sequência. Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância na vertical. Evitar tocar o fundo dos pocinhos.
- Em caso de dúvidas, contatar o Serviço de Atendimento ao Cliente, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

Interpretação

- O resultado do teste obtido utilizando este kit serve apenas como auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- A concentração sérica total de tiroxina depende de vários fatores, tais como o funcionamento e regulação da tireóide, a concentração de TBG e sua ligação à T4. Portanto, a concentração de T4 total não é suficiente para determinar o estado clínico.
- Os valores de T4 total podem estar aumentados em condições como gravidez e administração de contraceptivos orais. A determinação da T3 serve para estimar a concentração de TBG disponível, indicando se esta é a causa da variação no nível de T4.
- Valores diminuídos de T4 total são encontrados em doenças que envolvam eliminação de proteínas, certas doenças hepáticas e durante a administração de testosterona, difenilidantoina ou salicilatos.
- Este teste não é adequado para a avaliação em recém-nascidos.

VALORES ESPERADOS

- Para determinar os valores esperados neste teste por ELISA para T4 total, foi realizado um estudo em uma população adulta eutiróide. Os valores médios, desvios-padrão e valores esperados são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1 - Valores esperados para ELISA para T4 total (em µg/dL)

	Homens (N = 42)	Mulheres (N = 58)*
Média	7,6	8,2
Desvio padrão	1,6	1,7
Valores esperados	4,4 – 10,8	4,8 – 11,6

* pacientes normais com altos níveis de TBG não foram excluídos, exceto por gravidez

- É importante ressaltar que o estabelecimento de uma faixa de valores esperados para uma população, usando um determinado método, depende de vários fatores, tais como a especificidade do método, a população testada e a precisão na execução do método. Por estas razões, cada laboratório deve tentar estabelecer sua própria faixa de valores esperados usando a população em estudo.

PERFORMANCE

Precisão

Para determinar a precisão intra-análise e inter-análise, foram testados *pools* de soros-controle com diferentes níveis de tT4. O número de amostras (N), valores médios (X), desvio-padrão (dp) e coeficiente de variação (cv) para cada controle estão representados nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2 - Precisão Intra-análise (em µg/dL)

Amostra	N	X	dp	cv
Baixa	16	3,1	0,21	6,7%
Normal	16	8,9	0,27	3,0%
Alta	16	16,5	0,73	4,4%

TABELA 3 - Precisão Inter-análise (em µg/dL)

Amostra	N	X	dp	cv
Baixa	10	3,0	0,25	8,3%
Normal	10	8,7	0,32	3,7%
Alta	10	16,3	0,69	4,2%

N = experimentos em duplicata, em um período de 10 dias

Análise comparativa

O ELISA para tiroxina total foi comparado com método análogo por radioimunoensaio. Amostras biológicas (N = 131) de populações com hipotireoidismo, eutireoidismo e hipertireoidismo foram utilizadas (valores entre 0,8 e 25 µg/dL). As médias, a equação de regressão e o coeficiente de correlação obtido, apresentado na Tabela 4, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

TABELA 4 - Análise comparativa

Método	Média	Equação de regressão	Coefficiente de correlação
ELISA (x)	8,07	$y = 0,39 + 0,952 (x)$	0,934
referência (y)	8,06		

Sensibilidade

Este teste de ELISA para tT4 possui uma sensibilidade de 80 pg, equivalente a uma amostra com 0,4 µg/dL, calculada por determinação da variabilidade do soro-padrão com 0 ng/mL, utilizando 2 dp (95%) para calcular a dose mínima.

Especificidade

A possível reatividade cruzada do anticorpo anti-tiroxina foi calculada como a razão entre a dose de substância interferente e a dose de T4 necessária para deslocar a mesma quantidade de conjugado.

TABELA 5 - Reatividade Cruzada

Substância	Reatividade cruzada	Concentração
I-Tiroxina	1,0000	--
d-Tiroxina	0,9800	10 µg/dL
d-Triiodotironina	0,0150	100 µg/dL
I-Triiodotironina	0,0300	100 µg/dL
Iodotirosina	0,0001	100 µg/mL
Diiodotirosina	0,0001	100 µg/mL
Diiodotironina	0,0001	100 µg/mL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Barker SB. J Biol Chem 173: 175, 1948.
2. Chopra IJ et al. J Clin Endocrinol 33: 865, 1971.
3. Sterling L. Diagnostic and treatment of thyroid disease, Cleveland CRC Press, 19-51, 1975.
4. Young DS et al. Clin Chem 21: 3660, 1975.
5. Attwood EC et al. Clin Biochem 11 : 218, 1978.
6. Rae P et al. British Med J 307: 177, 1993.
7. Jain R et al. J Endocrinol Invest 17 : 631, 1994.
8. Charkes ND. Thyroid 6: 391, 1996.
9. Chou FF et al. Thyroid 9: 253.
10. Muzzaffari EL & Gharib H. Ann Intern Med 128: 386, 1998.

DISTRIBUIDO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda –**

CNPJ: 03654699000100

Av. José Cândido da Silveira 2100 - sl 10 – Horto – 30130-780 - Belo Horizonte, MG, Brasil – Resp.
Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452.

FABRICADO POR: **MBiolog Diagnóstica Ltda –**

CNPJ: 03590360000189

Rua Gama, 337 – Bairro Vila Paris – Contagem – 32372-120 – Belo Horizonte, MG, Brasil – Resp.
Técnico: Dr. Fabrício Galvão de Brito – CRF-MG 9587.

ANVISA: 80047580091