

Português**Função**

Imunoensaio para a determinação quantitativa in vitro da tiroxina em soro e plasma humanos.

O imunoensaio de electroquimioluminescência (electrochemiluminescence immunoassay ou "ECLIA") foi concebido para ser utilizado nos analisadores de imunoensaios Elecsys 1010/2010 e MODULAR ANALYTICS E170 (Módulo Elecsys) da Roche.

Características^{1,2,3}

A hormona tiroxina (T4) é o principal produto segregado pela tiróide e faz parte integrante do sistema de regulação hipotálamo-hipófise anterior-tiróide. Tem a função de influenciar anabolicamente o metabolismo.

A tiroxina é formada pela reacção de acoplamento de duas moléculas DIT (3,5-diiodotirosina) na glândula da tiróide. É armazenada, ligada à tiroglobulina, no lúmen dos folículos da tiróide, e é segregada conforme vai sendo necessário, sob a influência da TSH.^{1,2}

A maior parte (> 99%) da tiroxina total (T4) do soro está presente sob a forma ligada às proteínas. Como as concentrações das proteínas de transporte no soro estão sujeitas a efeitos exógenos e endógenos, o estado das proteínas de fixação tem também de ser tomado em consideração na determinação da concentração da hormona da tiróide no soro. Se este facto for ignorado, as alterações das proteínas de fixação (p. ex., devido a preparações que contêm estrogénios, durante a gravidez ou na presença de síndrome nefrótica, etc.) podem conduzir a avaliações erróneas do estado metabólico da tiróide.^{3,4,5,6,7} A determinação da T4 pode ser utilizada nas seguintes indicações: detecção de hipertiroidismo, detecção de hipotiroidismo primário e secundário e monitorização da terapêutica de supressão da TSH.⁸

O teste Elecsys T4 utiliza um princípio de teste de competição com um anticorpo dirigido especificamente contra a T4. A T4 endógena, ao ser libertada pela acção do ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico (ANS), compete com o derivado de T4 biotinilado adicionado para ocupação dos locais de fixação nos anticorpos marcados com o complexo de ruténio^a.

a) Complexo Tris(2,2'-bipiridil)ruténio(II) (Ru(bpy)₃²⁺)

Princípio do teste

Princípio de competição. Duração total do ensaio: 18 minutos.

- 1ª incubação: 15 µl de amostra e o anticorpo específico anti-T4, marcado com um complexo de ruténio; a T4 ligada é libertada das proteínas de fixação na amostra por ANS.
- 2ª incubação: Após incorporação das micropartículas revestidas de estreptavidina e da T4 biotinilada, os locais de fixação ainda livres do anticorpo marcado são ocupados, com a formação de um complexo anticorpo-hapteno. O complexo formado liga-se à fase sólida pela interacção da biotina e da estreptavidina.
- A mistura de reacção é aspirada para a célula de leitura, onde as micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eléctrodo. Os elementos não ligados são então removidos com ProCell. A aplicação de uma corrente eléctrica ao eléctrodo induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.
- Os resultados são determinados com base numa curva de calibração, que é gerada especificamente pelo analisador por uma calibração de 2 pontos, e uma curva principal incluída no código de barras do reagente.

Reagentes - soluções de trabalho

Dispositivo de reagentes Elecsys T4, Ref. 12017709 -200 testes

- | | |
|----|--|
| M | Micropartículas revestidas de estreptavidina (tampa transparente), 1 frasco, 12 ml:
Micropartículas revestidas de estreptavidina, 0,72 mg/ml; capacidade de ligação: 470 ng biotina/mg micropartículas; conservante. |
| R1 | Anticorpo anti-T4~Ru(bpy) ₃ ²⁺ (tampa cinzenta), 1 frasco, 18 ml:
Anticorpo policlonal anti-T4 (carneiro) marcado com complexo de ruténio 100 ng/ml; ANS 1 mg/ml; tampão fosfato 100 mmol/l, pH 7,4; conservante. |
| R2 | T4~biotina (tampa preta), 1 frasco, 18 ml:
T4 biotinilada 20 ng/ml; tampão fosfato 100 mmol/l, pH 7,4; conservante. |

Precauções e advertências

Para utilização em diagnóstico in vitro.

Respeite as precauções normais de manuseamento de reagentes laboratoriais. Elimine todos os resíduos de acordo com os regulamentos locais.

Ficha de segurança fornecida a pedido, para uso profissional.

Evite a formação de espuma com todos os reagentes e com todo o tipo de amostras (amostras de pacientes, calibradores e controlos).

Preparação dos reagentes

Os reagentes do dispositivo foram incluídos numa unidade pronta a ser utilizada que não pode ser separada.

Toda a informação necessária ao correcto funcionamento é introduzida no analisador através dos respectivos códigos de barras do reagente.

Conservação e estabilidade

Conservar a 2-8°C.

Coloque o dispositivo de reagentes Elecsys T4 **na vertical** para assegurar a total disponibilidade das micropartículas durante a mistura automática, antes da utilização.

Estabilidade:

em frasco fechado a 2-8°C:	até ao fim do prazo de validade indicado
após abertura a 2-8°C:	12 semanas
no analisador	8 semanas
MODULAR ANALYTICS E170:	
no analisador Elecsys 2010:	8 semanas
no analisador Elecsys 1010:	8 semanas (guardado alternadamente no frigorífico e no analisador - temperatura ambiente 20-25°C; até 20 horas no total quando aberto)

Colheita e preparação das amostras

Apenas as amostras indicadas em seguida foram testadas.

O soro é colhido em tubos de amostra padrão ou com gel separador.

Plasma tratado com heparina-Li, -Na, EDTA-K₃ e citrato de sódio.

Se for utilizado citrato de sódio, os resultados têm de ser corrigidos em +10%.

Critério: Recuperação dentro de 90-110% do valor sérico ou declive

0,9-1,1 + intercepção dentro de < ± 2 x sensibilidade analítica

+ coeficiente de correlação > 0,95.

Quando se utiliza fluoreto de sódio/oxalato de potássio, os resultados obtidos são aprox. 26% inferiores aos valores de soro.

Estabilidade: 7 dias a 2-8°C, 30 dias a -20°C.⁹ Congelar apenas uma vez.

Os diferentes tipos de amostras incluídos na lista foram testados com base numa selecção de tubos de colheita de amostras comercialmente disponíveis na altura em que o teste foi realizado, i.e. nem todos os tubos dos diferentes fabricantes disponíveis no mercado foram testados. Os sistemas de colheita de amostras de diferentes fabricantes podem, por sua vez, conter materiais diferentes que, em alguns casos, podem afectar os resultados dos testes. Ao utilizar amostras em tubos primários (sistemas de colheita de amostras), consulte as instruções do fabricante dos tubos.

As amostras que contêm precipitado têm de ser centrifugadas antes da realização do ensaio. Não utilize amostras inactivadas por calor. Não utilize amostras e controlos estabilizados com azida.

Antes da determinação, certifique-se de que as amostras dos pacientes, os calibradores e os controlos estão à temperatura ambiente (20-25°C).

Devido a possíveis efeitos de evaporação, as amostras, os calibradores e os controlos colocados no analisador deverão ser analisados no prazo de duas horas.

Materiais fornecidos

Consulte a secção "Reagentes - soluções de trabalho".

Materiais necessários (mas não fornecidos)

- Ref. 12017717, Elecsys T4 CalSet, 4 x 1 ml
 - Ref. 11731416, Elecsys PreciControl Universal, para 2 x 3 ml cada de PreciControl Universal 1 e 2
 - Equipamento normal de laboratório
 - Analisadores Elecsys 1010/2010 ou MODULAR ANALYTICS E170
- Acessórios para os analisadores Elecsys 1010 e 2010:
- Ref. 11662988, Elecsys ProCell, 6 x 380 ml de tampão do sistema



- Ref. 11662970, Elecsys CleanCell, 6 x 380 ml de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 11930346, Elecsys SysWash, 1 x 500 ml de aditivo para água de lavagem
- Ref. 11933159, Adaptador para SysClean
- Ref. 11706829, Elecsys 1010 AssayCup, 12 x 32 cubetes de reacção ou Ref. 11706802, Elecsys 2010 AssayCup, 60 x 60 de cubetes de reacção
- Ref. 11706799, Elecsys 2010 AssayTip, 30 x 120 pontas de pipeta

Acessórios para o analisador MODULAR ANALYTICS E170:

- Ref. 12135019, ProCell M, 1 x 2 l de tampão do sistema
- Ref. 12135027, CleanCell M, 1 x 2 l de solução de limpeza para a célula de leitura
- Ref. 03023141, PC/CC-Cups, 50 cubetes para pré-aquecimento do ProCell M e do CleanCell M antes de usar
- Ref. 03005712, ProbeWash M, 12 x 70 ml de solução de limpeza para finalização da análise e lavagem durante a mudança de reagentes
- Ref. 12102137, AssayTip/AssayCup Combimagazine M, 48 tabuleiros x 84 cubetes de reacção ou pontas de pipeta, sacos para lixo
- Ref. 03023150, Wasteliner, sacos para lixo
- Ref. 03027651, SysClean Adapter M

Acessórios para todos os analisadores:

- Ref. 11298500, Elecsys SysClean, 5 x 100 ml de solução de limpeza do sistema

Apenas disponível nos EUA:

- Ref. 11776673 Elecsys T4 CalCheck, 3 intervalos de concentração

Realização do ensaio

Para assegurar a correcta execução do ensaio, é importante cumprir as instruções fornecidas neste documento para o analisador utilizado. Consulte o manual do operador apropriado para obter informações mais específicas sobre o ensaio feito no analisador.

A ressuspensão das micropartículas é efectuada automaticamente antes de usar. Introduza os parâmetros específicos do teste através dos códigos de barras dos reagentes. Se, em algum caso excepcional, não for possível ler o código de barras, o código numérico de 15 dígitos deverá ser introduzido manualmente.

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20°C e coloque-os no disco dos reagentes (20°C) do analisador. Evite a formação de espuma. O sistema regula **automaticamente** a temperatura dos reagentes e a abertura/fecho dos frascos.

Analisador Elecsys 1010: Eleve a temperatura dos reagentes refrigerados até aprox. 20-25°C e coloque-os no disco dos reagentes/amostras do analisador (temperatura ambiente a 20-25°C). Evite a formação de espuma. **Abra** as tampas dos frascos **manualmente** antes de usar e **feche manualmente** depois de usar. Conserve a 2-8°C depois de usar.

Calibração

Rastreabilidade: O teste Elecsys T4 foi calibrado por espectrometria de massa com diluição do isótopo (ID-MS - isotope dilution mass spectrometry) em vários materiais de controlo^{10,11}

Cada dispositivo Elecsys T4 contém um código de barras com informações específicas para a calibração do lote de reagentes em questão. A curva principal previamente definida é adaptada ao analisador através do Elecsys T4 CalSet.

Frequência das calibrações: Uma calibração por lote de reagentes utilizando reagente recém-colocado (i.e., dentro de um máximo de 24 horas após ter sido registado no analisador). Devem ser feitas as seguintes recalibrações:

Analisadores MODULAR ANALYTICS E170 e Elecsys 2010:

- passado 1 mês (28 dias) quando se utiliza o mesmo lote de reagentes
- passados 7 dias (quando se utiliza o mesmo dispositivo de reagentes no analisador)

Analisador Elecsys 1010:

- com cada dispositivo de reagentes
- passados 7 dias (temperatura ambiente de 20-25°C)
- passados 3 dias (temperatura ambiente de 25-32°C)

Para todos os analisadores:

- conforme necessário: p. ex., em resultados de ensaios de controlo de qualidade fora dos limites especificados.

Verificação da calibração: Não é necessária. O software do analisador verifica automaticamente a validade da curva e alerta para eventuais desvios.

Controlo de qualidade

Para o controlo de qualidade, utilize o Elecsys PreciControl Universal 1 e 2. Adicionalmente pode ser utilizado outro material de controlo adequado.

Efectue os controlos dos diversos intervalos de concentração como determinações simples, pelo menos uma vez em cada 24 horas, quando o teste estiver a ser utilizado, uma vez por dispositivo de reagentes e a seguir a cada calibração. Os intervalos e limites de controlo devem ser adaptados às exigências específicas de cada laboratório. Os valores obtidos devem situar-se dentro dos limites definidos.

Cada laboratório deve estabelecer as medidas correctivas a tomar no caso de os valores se situarem fora dos limites.

Cálculo

O analisador calcula automaticamente a concentração de analito de cada amostra (em nmol/l, µg/dl ou ng/l).

Factores de conversão: nmol/l x 0,077688 = µg/dl
µg/dl x 12,872 = nmol/l
nmol/l x 0,77688 = µg/l

Limitações – interferências¹⁰

O ensaio não é afectado pela icterícia (bilirrubina < 633 µmol/l ou < 37 mg/dl), hemólise (Hb < 1,4 mmol/l ou < 2,3 g/dl), lipemia (triglicéridos < 28,5 mmol/l ou < 2.500 mg/dl) e biotina < 409 nmol/l ou < 100 ng/ml.

Critério: recuperação dentro de ± 10% do valor inicial.

Nos doentes em tratamento com doses elevadas de biotina (i.e.

> 5 mg/dia), as amostras só deverão ser colhidas no mínimo 8 horas após a última administração de biotina.

Não foi observada interferência do factor reumatóide até 2.400 UI/ml e de amostras de pacientes sujeitos a diálise.

Foram efectuados testes in vitro com 15 fármacos frequentemente utilizados.

Não se encontrou qualquer interferência com o ensaio.

Este teste não pode ser utilizado para determinar a T4 nos pacientes sujeitos a tratamento com agentes hipolipidémicos que contêm D-T4.

Se for necessário verificar o funcionamento da tiróide nesses pacientes, a terapêutica deverá ser interrompida durante 4-6 semanas para permitir o restabelecimento do estado fisiológico.¹²

Os auto-anticorpos para as hormonas da tiróide podem interferir com o ensaio.

O risco potencial de interferência por interações imunológicas entre os componentes do teste e soros raros foi minimizado através da inclusão de aditivos adequados.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para o ruténio.

O teste contém aditivos que minimizam estes efeitos.

Em casos isolados, podem ocorrer interferências devido a títulos extremamente elevados de anticorpos para a estreptavidina.

Quando o objectivo é o diagnóstico, os resultados devem ser sempre interpretados em conjunto com a anamnese do paciente, o exame clínico e outros resultados.

Intervalo de medição¹⁰

5,40-320,0 nmol/l ou 0,420-24,86 µg/dl (definido pelo limite de detecção inferior e pelo máximo da curva principal). Os valores inferiores ao limite de detecção são indicados como < 5,40 nmol/l ou < 0,42 µg/dl e os valores superiores ao intervalo de medição como > 320,0 nmol/l ou > 24,86 µg/dl.

Diluição

Não necessária devido à grande amplitude do intervalo de medição.

Valores teóricos¹⁰

Num estudo efectuado na Alemanha e no Japão com o teste Elecsys T4 em 2.526 amostras de soro de indivíduos com eutiroidismo obtiveram-se os seguintes valores (percentis 2,5-97,5):



66-181 nmol/l ou 5,1-14,1 µg/dl

O índice FT4 (T4/TBI) calculado em 825 amostras de soro de indivíduos eutiróidicos com função tiroidea normal utilizando o Elecsys T4 e o Elecsys T-Uptake (percentil 2,5–97,5) foi de:

62-164 nmol/l ou 4,8-12,7 µg/dl

Os valores seguintes foram determinados para o intervalo de percentil de 99% a partir de 275 amostras de soro e plasma de indivíduos saudáveis dos EUA:

59-154 nmol/l ou 4,6-12,0 µg/dl

Índice FT4:

57-147 nmol/l ou 4,4-11,4 µg/dl

Para obter informações mais pormenorizadas sobre intervalos de referência em crianças, adolescentes e grávidas, consulte a brochura "Reference Intervals for Children and Adults", Ref. do documento em inglês: 04640292, em alemão: 04625889.

Esta brochura contém também os resultados de um estudo detalhado sobre os factores que influenciam os parâmetros da tiróide num grupo de referência bem caracterizado de adultos. Foram aplicados critérios de inclusão e de exclusão diferentes (por ex. resultados de ecografias (volume e densidade da tiróide), bem como critérios que estão de acordo com as directrizes da National Academy of Clinical Biochemistry - NACB).

Cada laboratório deve verificar a transferibilidade dos valores teóricos para a sua própria população de pacientes e, se necessário, determinar os seus próprios intervalos de referência.

Dados específicos sobre o desempenho¹⁰

São apresentados a seguir dados representativos do desempenho nos analisadores. Os resultados podem diferir de laboratório para laboratório.

Precisão

A reprodutibilidade foi determinada com reagentes Elecsys, uma pool de soros humanos e controlos de acordo com um protocolo modificado (EP5-A) do NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards): 6 vezes por dia durante 10 dias (n = 60), precisão intra-ensaio no analisador MODULAR ANALYTICS E170, n = 21. Obtiveram-se os seguintes resultados:

Elecsys 1010/2010	Precisão intra-ensaio					Precisão total		
	Média		DP		CV	DP		CV
Amostra	nmol/l	µg/dl	nmol/l	µg/dl	%	nmol/l	µg/dl	%
SH ^b 1	33,4	2,59	1,56	0,12	4,7	2,31	0,18	6,9
SH 2	123	9,59	3,38	0,26	2,7	4,56	0,35	3,7
SH 3	237	18,4	5,97	0,46	2,5	6,98	0,54	3,0
PC U ^c 1	113	8,79	2,54	0,20	2,3	3,78	0,29	3,3
PC U2	181	14,0	3,58	0,28	2,0	4,90	0,28	2,7

b) SH = soro humano

c) PC U = PreciControl Universal

MODULAR ANALYTICS E170

Amostra	Precisão intra-ensaio					Precisão total				
	Média		DP		CV	Média		DP		CV
	nmol/l	µg/dl	nmol/l	µg/dl	%	nmol/l	µg/dl	nmol/l	µg/dl	%
SH 1	84,3	6,55	1,13	0,09	1,3	65,6	5,09	2,40	0,19	3,7
SH 2	63,1	4,90	1,14	0,09	1,8	79,1	6,15	2,67	0,21	3,4
SH 3	243	18,9	4,07	0,32	1,7	231	18,0	9,67	0,75	4,2
PC U1	90,3	7,01	1,15	0,09	1,3	92,9	7,22	3,51	0,27	3,8
PC U2	182	14,2	3,07	0,24	1,7	190	14,7	6,29	0,49	3,3

Sensibilidade analítica (limite de detecção inferior)

5,40 nmol/l (0,42 µg/dl)

O limite de detecção representa o nível de analito mais baixo mensurável passível de ser distinguido de zero. É calculado como o valor situado dois desvios padrão (DP) acima do padrão mais baixo (calibrador principal, padrão 1 + 2 DP, precisão intra-ensaio, n = 21).

Comparação dos métodos

Uma comparação dos testes Elecsys T4 (y) com o Enzymun-Test T4 (x), utilizando amostras clínicas, teve como resultado as seguintes correlações (em nmol/l):

Número de amostras medidas: 71

Passing/Bablok¹³ $y = 0,77x + 7,77$ $r = 0,841$

DP (md68) = 8,45

Regressão linear

 $y = 0,75x + 9,88$ $r = 0,975$

Sy.x = 8,76

As concentrações das amostras variaram entre aprox. 8 e 250 nmol/l (0,6 e 19 µg/dl).

Especificidade analítica

Para o derivado de anticorpo utilizado, observaram-se as seguintes reacções cruzadas:

L-T4 e D-T4 100%; L-T3 1,53%; D-T3 1,38%; 3-iodo-L-tirosina 0,002%; 3,5 diiodo-L-tirosina 0,01%; ácido 3,3',5,5'-tetraiodotiroacético 38,5%.

Bibliografia

1. Wheeler MH, Lazarus JH. Diseases of the Thyroid. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall Medical, 1994:108-115.
2. Pfannenstiel P, Saller B. Schilddrüsenerkrankheiten Diagnose und Therapie. Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH, 1995;2:43-62,97-106.
3. Wenzel KW. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. Metabolism 1981;30(7):717-732.
4. Burrow GN. Thyroid status in normal pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1990;71:274-275.
5. Lazarus JH, Othman S. Thyroid disease in relation to pregnancy. Clin Endocrinol 1991;34:91-98.
6. Fisher DA. Physiological variations in thyroid hormones; physiological and pathophysiological considerations. Clinical Chemistry 1996;42:1135-139.
7. Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. N Engl J Med 1994;331:1072-1078.
8. Nelson JC, Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. Clinical Chemistry 1996;42:1146-154.
9. Tietz NW. Clinical Guide To Laboratory Tests. 3rd ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co 1995:596.
10. Documentação da Roche Diagnostics.
11. Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenheer AP. Development of a New Method for the Determination of Thyroxine in Serum Based on Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry. Biological Mass Spectrometry 1994;23:475-482.
12. Bantle JP, Hunninghake DB, Frantz ID, Kuba K, Mariash CN, Oppenheimer JH. Comparison of Effectiveness of Thyrotropin-Suppressive Doses of D- and L-Thyroxine in Treatment of Hypercholesterolemia. Am J Med 1984;3:475-481.
13. Bablok W, et al. A General Regression Procedure for Method Transformation. J Clin Chem Clin Biochem 1988;26:783-790.

NOTA PARA O COMPRADOR: LIMITED LICENSE

A aquisição deste produto permite que o comprador o utilize exclusivamente para diagnóstico in vitro humano pela tecnologia ECL. Nenhuma patente geral ou outra licença de qualquer tipo, à excepção deste direito específico de uso de compra, é concedida por este meio. Este produto não pode ser usado pelo comprador na pesquisa/desenvolvimento em ciências da vida, em testes de auto-diagnóstico, na identificação/desenvolvimento de drogas ou em qualquer utilização ou teste veterinário, alimentar, de água ou ambiental.

Para mais informações, consulte o manual do operador adequado ao analisador, as folhas de aplicação respectivas, a informação do produto e os folhetos informativos de todos os componentes necessários.

As alterações ou os acréscimos significativos estão assinalados por uma barra de alteração na margem. As alterações dos parâmetros de teste do código de barras do reagente que já foram introduzidas devem ser editadas manualmente.
©2005 Roche Diagnostics



Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim

