

PATHOZYME® FREE TRIIODOTHYRONINE Ref OD457

Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczenia FT3 w ludzkiej surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Hormon tarczycy L-trijodotyronina, krążący we krwi prawie całkowicie (>99,5%) występuje w postaci związanej z nośnikami białkowymi. Głównym białkiem transportowym jest globulina wiążąca tyroksynę (TBG). Jednakże, tylko część wolnej trijodotyroniny jest uważana za formę biologicznie aktywną. Ponadto stężenie nośników białkowych zależy od wielu czynników klinicznych, takich jak np. ciąża. U niektórych pacjentów z prawidłowo funkcjonującą tarczycą, jeżeli zmienia się stężenie nośników białkowych, zmienia się również poziom całkowitego T3, z tym jednak, że stężenie wolnej trijodotyroniny (FT3) pozostaje stałe. A zatem, stężenie FT3 bardziej wiarygodnie koreluje ze statusem klinicznym, niż poziom całkowitej trijodotyroniny.

Na przykład, wzrost całkowitej trijodotyroniny związany z ciążą, dostawami środkami antykoncepcyjnymi i terapią estrogenową objawia się podwyższonym poziomem całkowitego T3, podczas gdy stężenie FT3 pozostaje zasadniczo niezmiennym.

Test **PATHOZYME FREE T3** dostarcza szybkiej, czulej metody do pomiaru T3 w surowicy przy użyciu przeciwciał T3 i znakowanego koniugatu.

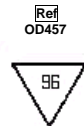
PRZEZNACZENIE

PATHOZYME FREE T3 jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia wolnej trijodotyroniny (FT3) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

ZASADA

Zestaw FT3 jest testem, w którym wykorzystano kompetycyjną metodę immunoenzymatyczną na fazie stałej. Surowice badanych pacjentów, standardy i koniugat enzymatyczny są dodawane do kubeczków opłaszczonych monoklonalnymi przeciwciałami T3. Po inkubacji w temperaturze pokojowej nadmiar koniugatu zostaje odpłukany. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na brak FT3 w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu solnego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości obecnego enzymu i odwrotnie zależna od ilości nieoznakowanego FT3 w próbce. Test wykalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU



Microtitre Plate	12 x 8 wells x 1
Dzielona mikropłytką z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torbie ze środkiem pochłaniającym wilgoć.	
Cal A	0 pg/ml 1ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona wolnej T3. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal B	Level as stated on vial 1ml
Standard referencyjny: wolne T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal C	Level as stated on vial 1ml
Standard referencyjny: wolne T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal D	Level as stated on vial 1ml
Standard referencyjny: wolne T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal E	Level as stated on vial 1ml
Standard referencyjny: wolne T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Cal F	Level as stated on vial 1ml
Standard referencyjny: wolne T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Conj	10.5ml
T3 HRP koniugat: koniugat T3 znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Różowy)	
Subs	TMB 11ml
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Soln	Stop HCl 1M 11ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)	
Instrukcja i druk protokołu.	1+1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl, 1000µl i 5000µl.
Końcówki do pipet.
Papier absorbacyjny.
Czytnik mikropłytek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME FREE T3** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV 1 i 2 – wynik negatywny oraz HBsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw **PATHOZYME FREE T3** nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw **PATHOZYME FREE T3** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME FREE T3** zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na butelce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Próbki mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy ustawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu. Mieszać delikatnie przez 20 - 30 sekund i przykryć kubeczki.
6. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
7. Ręczne plukanie: Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odkazający.
8. Napełnić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wyrzucić zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycie puste kubeczki 5-krotnie.
9. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
10. Plukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkazający. Przemycie puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną.
11. Po zakończeniu plukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C). Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
14. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
15. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikroplastyk przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane. Próbkę badaną i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikroplastyki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaszonych kubeczków mikroplastyki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przenieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wycisnąć wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczać roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdzić precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odzwierciedlenia wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{500}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach pg/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości FT3 w pg/ml dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyliczone wartości średnie.

Jeżeli wyniki kalibracyjna lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o równanie poligonalne z ekstrapolacją krzywej.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Wykreślona krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny odwrotnie proporcjonalny do uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest większa niż 1,5, a wartość absorbancji kalibratora F jest mniejsza niż 0,75. Zakres wartości prawidłowych FT3 uzyskany w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecznictwie otwartym wynosi 1,4 - 4,2 pg/ml. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME FREE T3** stężenie wolnej tyroksyny wynosi 0,05 pg/ml.

Substancja	Interferencja (%) równoważna w 10µg/ml trijodotyroniny
Tyroksyna	< 0.0002
Jodotyrozyna	< 0.0001
Dijodotyrozyna	< 0.0001
Dijodotyronina	< 0.0001
Fenylbutazon	< 0.0001
Salicylan sodowy	< 0.0001

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów. Współczynnik zmienności testu **PATHOZYME FREE T3** jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega **PATHOZYME FREE T3** kit i próbówkowego testu radioimmunologicznego użyto próbek o wartościach wolnej trijodotyroniny pomiędzy 0,1 a 14 pg/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	85
Współczynnik korelacji	0.955
Wartość nachylenia krzywej	0.925
Punkt przecięcia z osią OY	0.15
Wartość średnia testem Omega	3.4 pg/ml
Wartość średnia metodą radioimmunologiczną	3.5 pg/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

1. **Tietz, N.W.**, Fundamentals of Clinical Chemistry 2nd Ed., p602, Saunders Press, Phila. 1976.
2. **Horworth, P.J.N., Ward, R.L.** J.Clin.Pathol. 1972; 25:259-62.
3. **Sati, C., Chatter, A.J., Watts, N.** Fundamentals of Clinical Chemistry. Ed. Tietz, N.W. 3rd Ed. P586, Saunders Press Phila. 1987.
4. **Lundberg, P.A., Jagenburg, R., Lindstedt, G., Nystrom, E.** Clin. Chem. 1982; 28:1241.
5. **Melmed, S., Geola, F.L., Reed, A.W., Pekary, A.E., Park, J., Hershman, J.M.** Clin. Endocrin. Metabol. 1982; 54:300.
6. **Ingbar, S.H. et al.** J. Clin. Invest. 1965; 44:1679.
7. **Selenkow, H.A., and Robin, N.I.** J. Maine Med. Assoc. 1970; 61:199.
8. **Oppenheimer, J.H. et al.** J. Clin. Invest. 1962; 42:1769.
9. **Dick, M., Watson, F.** Med. J. Aust. 1980; 1:115.
10. **Dussault, J.H., Turcotte, R., and Gieyda, H.** Clin. Endocrin. Metabol. 1976; 43:232-285.
11. **Tarnoky, A.L.** Advan. Clin. Chem. 1981; 21:101-146.
12. **Emrich, D., Schondube, H., Sehlen, S., and Schreivagel, I.** Nuc. Compact. 1985; 16:392.
13. Procedures for Decontamination of Plumbing Systems Containing Copper and/or Lead azides, Dept. of H.E.W. N.I.O.S.H. Rockville, Maryland, 1976.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
2. Do każdego kubeczka dodać po 100µl koniugatu enzymatycznego i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
3. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20 - 25°C).
4. Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie wodą destylowaną.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu. Delikatnie mieszać przez 5 sekund.
6. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20 - 25°C).
7. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
8. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8118 Issue 5A Revised February 2011.

© Omega Diagnostics Ltd 2011. POLISH.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY