

PATHOZYME[®] TOTAL TRIIODOTHYRONINE ^{Ref} OD367

Enzaimunoensaio (EIA) para a detecção de T3 no soro humano

Conservar de 2°C a 8°C. NÃO CONGELAR.

Somente para Uso Diagnóstico in vitro.

INTRODUÇÃO

Triiodotironina (3, 5, 3'-triiodo-L-tironina, T3) e tiroxina (T4) são dois hormônios encontrados na corrente sanguínea. Aproximadamente 20% do T3 circulante é derivado da síntese direta e secreção pela glândula tireóide, enquanto 80% é produzido pela deionização de T4 nos tecidos periféricos. T3 é transportado através da corrente sanguínea periférica ligada a proteínas séricas, especificamente Globulina Ligante da Tiroxina (TBG), Prealbumina Ligante da Tiroxina (TBPA) e Albumina. Somente cerca de 0,3% do T3 sérico total não está ligada e livre para se difundir nos tecidos e exercer seu efeito biológico. T3 tem sua influência primária na velocidade do consumo de oxigênio e produção de calor em quase todos os tecidos. O hormônio também exerce um papel crítico no desenvolvimento do crescimento e na maturação sexual de mamíferos em crescimento.

T3 sérico total é um parâmetro usado na diferenciação e diagnóstico clínico de doenças da tireóide, particularmente hipertireoidismo. Na maioria dos pacientes com hipertireoidismo tanto T3 como T4 estão elevados. Entretanto, aproximadamente 5-10% de todos os casos de hipertireoidismo, tem concentrações elevadas de T3 acompanhadas de concentrações normais de T4, que é conhecida como T3-tirotoxicose. Em tais condições clínicas torna-se vital estabelecer que os níveis de T3 estão normais, antes de se excluir o diagnóstico de hipertireoidismo. Os níveis séricos de T3 são também um excelente indicador da capacidade da tireóide responder a testes de estímulo e supressão.

PATHOZYME T3 fornece um método sensível e rápido para a mensuração de T3 no soro não extraído usando anticorpo T3 e conjugado T3 enzimático marcado.

FINALIDADE DE USO

PATHOZYME T3 é um Enzaimunoensaio (EIA) para a determinação Quantitativa de triiodotironina T3 no soro humano. Somente para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

As cavidades da microplaca de titulação são revestidas com anticorpos de cabra anti-IgG de rato. Aplica-se o soro teste. Adiciona-se o conjugado enzimático T3 que compete com o T3 do soro por sítios de ligações disponíveis na fase sólida. Após a incubação, as cavidades são lavadas para a remoção de T3 ou conjugado não ligado e adiciona-se o substrato (TMB). A cor se desenvolverá somente nas cavidades onde a enzima estiver presente indicando a presença de T3 no soro. A reação enzimática é interrompida pela adição da Solução Bloqueadora e a absorbância é medida a 450 nm. Este teste foi calibrado segundo padrões internos. Não existe padronização internacional para este teste.

CONTUEDOS

^{Ref}
OD367



Microtitre Plate		12 x 8 cavidades x 1
Cavidades sensibilizadas com anticorpos específicos, acondicionadas em embalagens de alumínio com dessecante, que podem ser seladas novamente.		
Cal	A	0 ng/ml
Padrão referência: soro humano livre de T3. Pronto para uso. (incolor)		
Cal	B	0.75 ng/ml
Padrão referência: T3 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)		
Cal	C	1.5 ng/ml
Padrão referência: T3 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)		
Cal	D	3.0 ng/ml
Padrão referência: T3 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)		
Cal	E	6.0 ng/ml
Padrão referência: T3 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)		
Cal	F	10 ng/ml
Padrão referência: T3 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)		
Washbuf	20X	50 ml
Tampão de Lavagem concentrado: Tampão Tris contendo Detergentes (incolor)		
Ab	REAG	7ml
Anticorpo anti-T3 de rato. Pronto para uso. (roxo)		
Conj	11X	1.3ml
Conjugado T3HRP concentrado. T3 conjugado a peroxidase Pronto para uso. (incolor)		
DIL	Conj	12ml
Diluinte do conjugado: Tampão fosfato contendo estabilizantes. Solução de trabalho, (verde)		
Subs	TMB	11ml
Solução substrato (TMB) Pronto para uso. (incolor)		
Soln	Stop	HCl
Solução Stop: Acido Clorídrico diluído em água purificada. Pronto a usar. (incolor)		

Instruções de uso. Folha de Registro de Dados EIA 1+1

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Micropipetas: 100, 200, 1000 e 5000 µl.
- Poineteiras descartáveis
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Papel gráfico
- Vidraria de laboratório limpa

PRECAUÇÕES

PATHOZYME T3 contém materiais de origem humana que foram testados e confirmados com resultado negativo para anticorpos anti-HCV, anti-HIV I e II e HBsAg através de procedimentos aprovados, sendo realizados para cada doador. Como nenhum teste pode oferecer uma completa segurança que produtos derivados de material humano não transmitam agentes infecciosos, recomenda-se que os reagentes contidos neste kit sejam manuseados com o devido cuidado e atenção durante o uso e descarte. Todos os reagentes devem portanto ser tratados como material de potencial risco biológico durante o uso e descarte. Não ingerir.

PATHOZYME T3 não contém substâncias perigosas como definido no regulamento UK Chemicals (Informações e Embalagem para fornecimento de material de Risco). Entretanto, todos os reagentes devem ser tratados como de risco biológico potencial durante o uso e descarte. O descarte final deve ser realizado de acordo com a legislação local.

A solução stop PATHOZYME T3 é de Ácido Clorídrico sendo, portanto, corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

PATHOZYME T3 contém reagentes com 1% Proclin[™] 300* como conservante, que pode ser tóxico caso seja ingerido. Em caso de contato, lavar completamente com água corrente.

* Proclin[™] 300 é uma marca comercial pertencente a ROHM e HAAS limitada.

ARMAZENAMENTO

Os reagentes devem ser armazenados a temperatura entre 2°C a 8°C.

A data de vencimento é o último dia do mês indicado nos rótulos dos frascos e do kit. O kit funcionará dentro das especificações até a data de vencimento estipulada, baseada na data de fabricação do produto e impressa no kit e em seus componentes. Não utilizar os reagentes após a data de vencimento. Evitar a exposição a temperaturas excessivas. Não expor diretamente a luz solar.

NÃO CONGELAR NENHUM DOS REAGENTES pois isso causará danos irreversíveis.

COLETA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Obter uma amostra de sangue venoso do paciente, permitindo que o coágulo seja formado e retraído. Centrifugar a amostra de sangue coagulada e coletar o soro límpido. O teste requer amostra de soro fresco.

Não usar soro hemolisado, contaminado ou lipêmico para o teste, pois isso afetará desfavoravelmente os resultados.

O soro pode ser armazenado a 2°C a 8°C por até 48 horas antes do uso. Se for necessário um armazenamento mais longo, armazenar a -20°C por até 1 ano. Amostras descongeladas devem ser homogeneizadas antes do uso.

Não usar azida sódica como conservante pois esta poderá inibir o sistema enzimático peroxidase. Não congelar e descongelar repetidamente o soro, pois isso pode causar resultados falsos.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes devem estar à temperatura ambiente (20 °C a 25°C) e devem ser homogeneizados antes do uso. Evitar a formação de espuma.

Conjugado:

Diluir o conjugado concentrado usando 1 parte de conjugado concentrado e 10 partes de diluinte de conjugado. Adicionar 0,1ml de conjugado concentrado a 1,0ml de diluinte de conjugado. Este procedimento pode ser realizado 20 minutos antes do início do teste. Certificar-se que o conjugado diluído está à temperatura ambiente. Não induzir a formação de espuma. Usar dentro de 24 horas.

Tampão de lavagem:

Diluir o Tampão de Lavagem concentrado utilizando 1 parte do Tampão de Lavagem concentrado com 19 partes de água destilada. Para cada tira com oito cavidades, preparar 25 ml de tampão diluído pela adição de 1,25 ml de tampão de lavagem concentrado a 23,75 ml de água destilada. Preparar a solução tampão de lavagem diluída antes de cada ensaio. Tampão de lavagem extra é fornecido para equipamentos de lavagem automatizados.

O procedimento de lavagem é crítico para o resultado do teste. Lavagem insuficiente irá resultar em fraca precisão e leituras falsas.

LIMITAÇÕES DE USO

A utilização de outras amostras que não sejam soro, não foi validada para este teste. Não existe protocolo para a reutilização deste produto. Levar em conta todos os dados clínicos na interpretação dos testes. O diagnóstico não deve ser feito baseado somente nos dados de um ensaio clínico.

PROCEDIMENTO DO ENSAIO

1. Deixar todos os componentes do kit e o soro teste atingirem a temperatura ambiente (20°C a 25°C) antes de iniciar o ensaio.
2. Um conjunto de padrões do kit deve ser testado com cada grupo de amostras. Selecionar o número de cavidades desejadas prendendo-as no suporte. Anotar a posição do soro controle e dos soros testes na "Folha de Registro de Dados EIA" fornecida.
3. As tiras que não forem usadas devem ser seladas novamente na embalagem de alumínio contendo o dessecante, utilizando-se o selador "zip-lock", antes de serem recolocadas 2°C a 8°C.
4. Dispensar 50µl de padrões e soro teste em cada cavidade determinada.
5. Dispensar 50µl de Reagente Anticorpo em cada cavidade.
6. Homogeneizar completamente por 30 segundos. É muito importante estar completamente misturado.
7. Dispensar 100µl de solução de trabalho de conjugado em cada cavidade. Homogeneizar completamente por 30 segundos.
8. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente de 20°C a 25°C
9. No final do período de incubação, descartar o conteúdo das cavidades com um rápido movimento, no recipiente de material contaminado. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Assegurar-se que o recipiente de material contaminado contém um desinfetante apropriado.
10. Lavagem manual: Preencher as cavidades com um mínimo de 300 µl de Tampão de Lavagem por cavidade. Despejar o tampão de dentro das cavidades para o interior do recipiente de material contaminado.
11. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Lavar as cavidades vazias 5 vezes.
12. Lavagem automática: assegurar-se que 300 µl de Tampão de Lavagem serão dispensados por cavidade e que o recipiente de material contaminado contém um desinfetante apropriado. Lavar as cavidades vazias 5 vezes. Após lavagem remover o excesso de fluido batendo as cavidades sobre papel absorvente ou papel toalha, para retirar todo o resíduo de água.
13. Dispensar 100 µl da Solução Substrato em cada cavidade e homogeneizar suavemente por 5 segundos.
14. Incubar no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
15. Interromper a reação pela adição de 100 µl da Solução de Bloqueio em cada cavidade.
16. Homogeneizar suavemente por 30 segundos para certificar-se que a cor azul mudará completamente para amarelo nas cavidades
17. Ler a densidade óptica a 450 nm com um leitor de microplacas **imediatamente** após o bloqueio da reação.

RESOLUÇÃO DE PROBLEMAS

Para uso por operadores com um mínimo de treinamento básico em laboratório. Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados. Utilizar ponteiros separadas para cada amostra a fim de prevenir a contaminação cruzada. Teste em duplicata dos padrões e amostras, apesar de não requerido, é recomendado. As amostras e controles devem ser testados ao mesmo tempo para que as condições do teste sejam as mesmas. Caso se realize pipetagem manual, recomenda-se não se utilizar mais que 32 cavidades em cada ensaio e que a pipetagem de todos os padrões e amostras seja realizada dentro de 3 minutos. Uma placa completa de 96 cavidades pode ser utilizada se houver disponibilidade de pipetagem automatizada. Recolocar as tampas em todos os reagentes imediatamente após o uso. Evitar pipetagem repetidas dos reagentes estoques porque isso poderá causar contaminação. Não misturar reagentes ou cavidades marcadas com anticorpos de diferentes kits. Cuidado para não tocar a superfície da cavidade durante a dispensação. Evitar que os reagentes escorram pela parede da cavidade. Antes de iniciar o teste deixar os reagentes atingirem a temperatura ambiente (20°C a 25°C). Homogeneizar todos os reagentes, com cuidado, por inversão ou rotação. Uma vez iniciado o teste não deixar que as cavidades sequem. Não contaminar a Solução Substrato o que inutilizará o kit. Checar a precisão e exatidão dos equipamentos laboratoriais utilizados durante o procedimento para assegurar resultados reprodutíveis. As tiras não utilizadas devem ser seladas novamente dentro da embalagem de alumínio contendo o dessecante, utilizando-se para isso o "zip-lock" e armazenadas a 2°C a 8°C.

CÁLCULO DOS RESULTADOS

Calcular a absorbância de cada padrão e amostras. Construir uma curva padrão em um papel de gráfico, colocando os valores obtidos das absorbâncias de cada padrão versus a sua concentração em ng/ml, com os valores da absorbância no eixo Y e as concentrações no eixo X. Usar os valores de absorbância de cada amostra para determinar a concentração correspondente de T3 em ng/ml utilizando a curva padrão. Se os níveis dos calibradores ou amostras conhecidas não fornecerem os resultados esperados, os resultados dos testes devem ser considerados inválidos.

VALORES ESPERADOS E SENSIBILIDADE

O gráfico produzido pelos calibradores deve ter a forma de uma hipérbole com a DO 450 dos calibradores, inversamente proporcional as suas concentrações. A DO do calibrador A deve ser maior que 1,5 e a DO do calibrador F deve ser menor que 0,75 para que os resultados dos testes sejam válidos. Baseados em amostras laboratoriais clínicas de pacientes externos randomizados a faixa de valores normais para T3 é 0,8 a 1,9ng/ml. O mínimo detectável de T3 com **PATHOZYME T3** é estimado em 0,2ng/ml.

AVALIAÇÃO DOS DADOS

Calibrado para os maiores competidores e padrões internos. O coeficiente de variação do **PATHOZYME T3** é menor ou igual a 10%.

Uma avaliação entre o kit Omega **PATHOZYME T3** Total e o kit Abbott AxSym T3 Total para amostras com níveis entre 0,32 e 5,9ng/ml os seguintes dados foram registrados:

Numero de amostras	67
Coefficiente de correlação	0,906
Inclinação	0,920
Intercessão	-0,229
Omega	1,24ng/ml
Abbott	0,91ng/ml

Uma avaliação entre o kit Omega **PATHOZYME T3** Total e o kit Monobind T3 Total para amostras com níveis entre 0,14 e 6,2ng/ml os seguintes dados foram registrados:

Numero de amostras	67
Coefficiente de correlação	0,993
Inclinação	1,004
Intercessão	-0,084
Omega	1,21ng/ml
Abbott	1,13ng/ml

Esses dois estudos mostraram que os kits tiveram uma boa correlação

REFERÊNCIAS

- 1- Walker W.H.O. Clin. Chem. 1977; 23:384.
2. Kirkegaard, C., Friis, T. Et al. Acta Endocrinol. 1974;22:1243.
3. Wisdom, G. B. Clin. Chem. 1976;22:1243
4. Hoffenberg, R. Medicine 1978; 6:392.
5. Liebligh, J. Utiger R.D. J. Clin. Invest. 1972; 51:1939.
6. Larson, P.R. Metabolism 21, 1073-1092(1972).

PROCEDIMENTO RÁPIDO

1. Dispensar 50µl do Soro Teste, Controles ou Calibradores.
2. Dispensar 50µl de Reagente Anticorpo em cada cavidade e misturar bem por 30 segundos.
3. Dispensar 100µl de Solução de Trabalho do Conjugado em cada cavidade e misturar bem por 30 segundos.
4. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente (20° C a 25° C).
5. Descartar os conteúdos das cavidades e lavar 5 vezes.
6. Adicionar 100µl de Solução Substrato em cada cavidade. Homogeneizar gentilmente por 5 segundos.
7. Incubar 20 minutos no escuro a temperatura ambiente (20° C a 25° C).
8. Adicionar 100µl de Solução de Bloqueio em cada cavidade e homogeneizar por 30 segundos.
9. Ler as Densidades ópticas imediatamente (no máximo em 10 minutos) usando um leitor de microplaca com filtro de 450 nm.

8086 ISSUE 8 Revised November 2005 PORTUGUESE
©Omega Diagnostics Ltd., 2005



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