

PATHOZYME[®] FREE TRIIODOTHYRONINE Ref OD457

Enzima Imunoensaio (EIA) para a detecção quantitativa de fT3

Em soro humano.

Conservar entre os 2°C a 8°C NÃO CONGELAR

Apenas para diagnóstico in vitro.

INTRODUÇÃO

A L-Triiodotironina, uma hormona da tiróide, circula no sangue praticamente ligada a proteínas de transporte. A principal proteína de transporte é a globulina ligada à tiroxina (TBG). Contudo, julga-se que apenas a fração livre (não ligada) da triiodotironina é responsável pela acção biológica. Além disso, as concentrações das proteínas de transporte podem sofrer alterações em determinadas condições clínicas, tais como na gravidez. Em indivíduos com função normal da tiróide, se eventualmente as concentrações das proteínas de transporte variam, os níveis de T3 total também variam de modo a que a concentração de triiodotironina livre (fT3) permaneça constante. Daqui pode concluir-se que a determinação das concentrações de fT3 são mais correlacionáveis com a situação clínica do que os níveis de triiodotironina total associados com a gravidez, contraceptivos orais e terapia com estrogénios resultam num aumento dos níveis de T3 total enquanto que a concentração de fT3 permanece inalterável.

O enzima Imunoensaio PATHOZYME FREE T3 constitui um método rápido, sensível para o dosamento de T3 em soro utilizando anticorpos T3 e conjugado enzimático marcado.

INTERESSE CLÍNICO

PATHOZYME FREE T3 é um enzima imunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa da Triiodotironina livre (fT3) em soro humano.

PRINCÍPIO DO TESTE

O fT3 é um enzima imunoensaio de competição de fase sólida. As amostras, calibradores e Conjugado são adicionados aos poços revestidos com anticorpos monoclonais T3. O fT3 presente na amostra e o conjugado marcado com T3 competem para se fixarem nos sítios de ligação disponíveis do anticorpo. Após a incubação à temperatura ambiente, os poços são lavados com água destilada para que seja removido o conjugado não ligado. Com a adição do substrato, Tetrametil Benzidina (TMB) desenvolve-se uma coloração apenas nos poços onde está presente a enzima, o que indica a ausência de fT3. A reacção é parada pela adição de ácido clorídrico diluído, a absorção é medida a 450nm. Este teste foi calibrado de acordo com as nossas referências-padrão. Não existem ainda referências internacionais para este teste.

CONTEUDOS

Ref
OD457



Microtitre Plate	12 x 8 wells x 1
Poços em tiras fracionáveis revestidos com anticorpos específicos dentro de um invólucro de alumínio com excicante	
Cal A	0 ng/ml 1 ml
Calibrador de Referência: Soro humano sem T3 livres. Pronto a usar. (Incolor)	
Cal B	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T3 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
Cal C	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T3 livre diluído em soro humano. Pronto a usar (Incolor)	
Cal D	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T3 livre diluído em soro humano. Pronto a usar (Incolor)	
Cal E	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T3 livre diluído em soro humano. Pronto a usar (Incolor)	
Cal F	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T3 livre diluído em soro humano. Pronto a usar (Incolor)	
Conj	10.5ml
Conjugado T3 HRP: T3 conjugado a Peroxidase. Pronto a usar. (rosa)	
Subs TMB	11ml
Solução Substrato: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidina em tampão citrato. Pronto a usar. (Incolor)	
Soln Stop HCl 1M	11ml
Solução de Paragem: Ácido Sulfúrico diluído em água purificada. Pronto a usar. (Incolor)	
Folheto de Instruções e Folha de registo de dados EIA	1 + 1

MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

Micropipetas: 100µl, 200µl, 1000µl e 5000µl
Pipetas descartáveis (pontas)
Papel absorvente
Leitor de microplacas com um filtro de 450 nm
Papel gráfico
Equipamento de laboratório de vidro limpo.

PRECAUÇÕES

PATHOZYME FREE T3 contém materiais de origem humana que foram testados e confirmados como negativos em relação aos anticorpos anti HCV, HIV I e HIV II e também HBsAg de acordo com os procedimentos aprovados pela FDA. Nenhum teste pode assegurar que produtos de origem humana não transmitam agentes infecciosos. Por essa razão, os reagentes deverão ser considerados como potencial fonte de contágio e deverão ser manuseados com máximo cuidado e atenção durante o seu uso e quando descartados. Não ingerir.

Os reagentes PATHOZYME FREE T3 contém substâncias perigosas de acordo com a regulamentação de UK Chemicals (*Hazardous Information and Packaging for Supply*). De qualquer modo, todos os reagentes devem ser tratados como potenciais contaminantes durante a utilização e aquando do descarteamento. O tratamento final aplicado aos reagentes já utilizados deve ser realizado de acordo com a legislação local.

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

Os reagentes **PATHOZYME FREE T3** contêm 1.0% de Proclin 300TM como conservante, este poderá ser tóxico se ingerido. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

* Proclin 300TM é uma marca registrada pertencente à ROHM e HAAS Limitada.

CONSERVAÇÃO

Os kits devem ser conservados a uma temperatura entre 2°C a 8°C.

O kit terá uma performance de acordo com as especificações durante o período de validade indicado pelo fabricante e indicado na embalagem do kit e seus componentes. Não utilizar reagentes após o prazo indicado na embalagem.

Deve-se evitar a exposição dos componentes do kit a temperaturas excessivamente elevadas. Conservar ao abrigo de luz directa.

NÃO CONGELAR NENHUM DOS REAGENTES. Isto pode causar danos irreversíveis.

COLHEITA E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra de sangue é colhida, após a formação do coágulo, centrifugar a amostra e colectar o soro. São necessárias amostras frescas de soro.

Não utilizar amostras de soro hemolizadas, contaminadas ou lipémicas pois podem interferir nos resultados

As amostras de soro devem ser conservadas a 2°C – 8°C até 48 horas. Para um maior período de conservação, até 1 ano, as amostras devem ser congeladas a -20°C. As amostras que forem descongeladas devem ser homogeneizadas antes da realização do teste.

Não utilizar Ázida de Sódio como conservante. Este pode inibir o sistema da enzima peroxidase.

Evitar descongelação e recongelação, o que pode provocar resultados falsos positivos.

PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

Todos os reagentes estar à temperatura ambiente antes da execução do teste (20°C to 25°C) e devem ser agitados antes de serem utilizados. Não induzir espuma.

LIMITAÇÕES DO TESTE

A utilização de outras amostras para além de soro não é valida para este teste. Não existe qualquer protocolo de reutilização deste produto. Um resultado positivo baixo ou suspeito deverá ser reconfirmado. O diagnóstico não deve ser feito com base unicamente num só resultado. É recomendado levar todos os dados clínicos em consideração

PROCEDIMENTO

- Os componentes do kit deverão estar à temperatura ambiente antes de se iniciar o teste (20°C to 25°C).
- Deverá ser executado uma série de testes padrão com cada lote de soro de teste. Reservar o número de poços que se pretende. Registrar a posição dos standards e o soro de teste na folha de dados EIA.
- As tiras que não forem utilizadas deverão ser colocadas, e seladas, de novo no invólucro de alumínio contendo o excicante, antes de se conservar entre os 2°C a 8°C.
- Pipetar 50µl do soro padrão, controlo ou amostra de soro para o poço respectivo.
- Pipetar 100µl de Solução de conjugado de Triiodotironina em todos os poços. Agitar a microplaca levemente durante 20 a 30 segundos e cobrir.
- Incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente. (20°C a 25°C)
- Lavagem Manual: Encher os poços com um mínimo de 300µl de água destilada por poço. Deitar os conteúdos da placa num contentor de resíduos. Passar os poços por papel absorvente. Lavar os poços vazios 5 vezes.
- Passar os poços em papel absorvente ou em toalhas de papel para remover todos os resíduos de água.
- Lavagem Automática: Verificar se cada poço tem 300µl de água destilada de e que o desinfetante apropriado é adicionado ao frasco de colecta de desperdício. Lavar os poços vazios 5 vezes. Após a lavagem, retirar fluido em excesso passando os poços por papel absorvente ou toalhas de papel para remover os resíduos de líquido.
- Pipetar 100µl de Substrato a todos os poços.
- Incubar no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente (20°C to 25°C).
- Parar a reacção adicionando 100µl de Solução de Paragem a cada poço.
- Agitar durante 30 segundos. É importante certificar que a cor azul muda completamente para uma cor amarela.
- Medir a absorção de cada poço, a 450 nm. Ler após 10 minutos.

RECOMENDAÇÕES

O kit deve ser manuseado apenas por pessoal qualificado.

Não utilizar componentes do kit danificados ou contaminados.

Utilizar uma pipeta descartável para cada amostra de modo a prevenir contaminações.

É recomendada a duplicação de todos os testes padrão e amostras, apesar de não ser um requisito obrigatório.

As amostras e os testes padrão devem ser executados ao mesmo tempo assim mantendo as condições de testagem.

Não é recomendada a utilização de mais de 32 poços por cada série de ensaios se for utilizado pipetagem manual, visto que a pipetagem de todos os standards e amostras deverá estar completa em 3 minutos. Poderá ser utilizada uma placa de 96 poços se a pipetagem automática estiver disponível.

Fechar todos os reagentes imediatamente após o seu uso.

Evitar pipetar repetidamente de reagentes em stock visto que pode causar contaminação.

Não misturar reagentes ou tiras revestidas de anticorpos de kits diferentes. Aquando da pipetagem deverá haver cuidado para não se tocar na superfície do poço.

Não deixar que os reagentes escorram pelos lados do poço. Os componentes do kit deverão estar à temperatura ambiente antes de se iniciar o teste (20°C a 25°C). Misturar cuidadosamente os reagentes usando movimentos circulares ou invertendo os frascos.

Uma vez iniciado o teste, os poços não podem ficar secos durante este.

Não contaminar a Solução Substrato visto que torna todo o kit inoperativo.

Verificar a precisão do equipamento de laboratório utilizado durante o processo a fim de assegurar resultados reproduzíveis.

As tiras que não forem usadas deverão ser novamente seladas no invólucro de alumínio, contendo o excipiente, antes de serem conservadas entre os 2°C a 8°C.

CALCULO DOS RESULTADOS

Determinar a média das absorvâncias (A_{550}) para cada conjunto de padrões e de amostras de doentes. Traçar uma curva de calibração distribuída a média das absorvâncias de cada padrão, contra a sua concentração em pg/ml em papel gráfico. Os valores das absorvâncias devem ser distribuídas no eixo Y e as concentrações no eixo X. Utilizar os valores médios das absorvâncias de cada amostra para determinar a concentração de FT3 correspondente em pg/ml na curva de calibração.

Se os calibradores e eventuais amostras conhecidas não apresentarem os resultados esperados, os testes devem ser considerados inválidos.

Caso esteja a utilizar o software do kit escolha um polígono com curva de extrapolação de dados.

Com base num estudo feito numa amostragem de pessoas saudáveis, o intervalo de referência FT3 é de 1.4 – 4.2 pg/ml. A concentração mínima de FT3 detectável pelo kit **PATHOZYME FREE T3** foi estimada em 0.05 pg/ml.

Substância	Reações Cruzadas (%) equivalentes a 10µg/ml de Triiodotironina
Tiroxina	< 0.0002
Iodotirosina	< 0.0001
Diiodotirosina	< 0.0001
Diiodotironina	< 0.0001
Phenylbutazone?	< 0.0001
Salicilato de Sódio	< 0.0001

DADOS DE AVALIAÇÃO

O coeficiente de variação do **PATHOZYME FT3** é menor ou igual a 10%.

Os dados seguintes foram obtidos de uma avaliação entre o kit Pathozyme Free T3 da Omega e um radioimunoensaio de método semelhante em amostras com níveis entre 0.1 e 14 pg/ml.

Numero de Amostras	85
Coefficiente de Correlação	0.955
Declive	0.925
Intercepção	0.15
Média com o kit da Omega	3.4 pg/ml
Média com o Radioimunoensaio	3.5 pg/ml

Os resultados apresentaram boa correlação entre os dois kits.

VALORES ESPERADOS E SENSIBILIDADE

O gráfico dos calibradores deve apresentar uma forma hiperbólica com a DO 450 dos calibradores inversamente proporcional à sua concentração. A DO do calibrador A deve ser mais elevada que 1.5 e a DO do calibrador F deve ser inferior a 0.75 para que os resultados do teste sejam considerados válidos.

REFERÊNCIAS

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., Chattor, 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., Hershmen, 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 Gleyda, H.** Clin. Endocrin. Metabol. 1976; 43:232-285.
11. **Tamoky, 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.

RESUMO DA EXECUÇÃO DO TESTE

1. Pipetar 50µl dos calibradores ou da amostra a ser testada em cada poço.
2. Pipetar 100µl de conjugado em cada poço e agitar suavemente durante 30 segundos.
3. Incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C)
4. Deitar fora os conteúdos do poço e lavar 5 vezes com água destilada.
5. Adicionar 100µl a solução substrato a cada poço. Agitar suavemente durante 5 segundos.
6. Incubar no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente (20°C a 25°C).
7. Adicionar 100µl de solução de paragem a cada poço e agitar suavemente durante 30 segundos.
8. Ler de imediato as densidades ópticas com um leitor de microplacas com um filtro a 450 nm.

8118 ISSUE 5A Revised February 2011

© Omega Diagnostics Ltd., 2011. **PORTUGUESE**



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