

PATHOZYME[®] TOTAL TRIIODOTHYRONINE **Ref** OD367

Immunoenzymatyczny test (EIA) do oznaczania całkowitej trijodotyroniny (T3) w ludzkiej surowicy.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.

Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Trijodotyronina i tyroksyna należą do dwóch aktywnych hormonów obecnych w krążącej krwi. Około 20% krążącego T3 pochodzi z bezpośredniej syntezy i sekrecji z tarczycy, podczas gdy 80% powstaje w wyniku oddejdowania T4 w tkankach obwodowych. T3 jest transportowane krwią obwodową gdzie przede wszystkim ulega przyłączeniu do nośników białkowych, głównie do globuliny wiążącej tyroksynę (TBG), prealbuminy (TBPA) i albuminy. Tylko około 0,3% całkowitej T3 jest niezwiązane i swobodnie dyfunduje do tkanek gdzie wykazuje działanie biologiczne. T3 ma zasadnicze oddziaływanie na szybkość zużycia tlenu i wytwarzania ciepła prawie we wszystkich tkankach. Hormon ten odgrywa również decydującą rolę w czasie wzrostu, rozwoju i dojrzewaniu płciowym ssaków. Całkowite T3 jest parametrem wykorzystywanym przy różnicowaniu i klinicznym diagnozowaniu chorób tarczycy, szczególnie w nadczynności tarczycy. U większości pacjentów z nadczynnością tarczycy obserwuje się wzrost stężenia hormonów T3 i T4. Chociaż u około 5-10% przypadków z nadczynnością tarczycy występuje wzrost stężenia T3 z towarzyszącym prawidłowym stężeniem T4, które określane jest jako T3-tyreotoksikoza. Te kliniczne badania są niezbędne aby określić, czy poziom T3 jest prawidłowy, przed wykluczeniem nadczynności tarczycy. Poziom T3 surowicy jest również doskonałym wskaźnikiem zdolności tarczycy na odpowiedź testami stymulacji i supresji.

Immunoenzymatyczny test **PATHOZYME T3** dostarcza szybkiej, złej metody do pomiaru T3 w surowicy przy użyciu przeciwciał T3 i znakowanego koniugatu.

PRZEZNACZENIE

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

ZASADA

Kubeczki mikropyłki opłaszczane są kozimi anti-mysimi IgG przeciwciałami. Do testu należy użyć surowicy wraz z odczynnikami zawierającymi przeciwciała. T3 obecne w badanej surowicy współzawodniczy o miejsce wiążące na fazie stałej po dodaniu koniugatu enzymatycznego. Po inkubacji kubeczki są płukane wodą w celu usunięcia nie związanego T3 lub nadmiaru koniugatu. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, która pojawia się tylko w tych kubeczkach, w których obecny jest związany koniugat enzymatyczny, wskazujący na brak T3 w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńzonego kwasu siarkowego, a pomiar absorbancji dokonywany jest przy długości fali 450 nm. Test wykalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

Ref
OD367



12 x 8 wells x 1

Microtitre Plate				
Dzielona mikropyłka z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torbie ze środkiem pochłaniającym wilgoć.				
Cal	A	0 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona T3. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	B	0.75 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	C	1.5 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	D	3.0 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	E	6.0 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	F	10 ng / ml		1ml
Standard referencyjny: T3 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Washbuf 20X				50ml
Koncentrat buforu myjącego: buforowany roztwór Tris zawierający detergenty. (Bezbarwny)				
Ab	REAG			7ml
Mysie anti-T3 przeciwciała. Gotowe do użycia. (Różowy)				
Conj	11 X			1.3ml
T3 HRP koncentrat koniugatu: koniugat T3 znakowany peroksydazą chrzanową. (Bezbarwny)				
DIL	Conj			12ml
Rozcieńczalnik koniugatu: buforowany roztwór fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Roztwór roboczy. (Zielony)				
Subs	TMB			11ml
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Soln	Stop	HCl	1 M	11ml
Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w oczyszczonej 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 absorbujący.
Czytnik mikropyłek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrowy.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

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

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME T3** zawierają 1% Proclin[™] 300 jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu płukać 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 buteleczce 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 świeżą surowicę.

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.

Koniugat: Rozcieńczyć koncentrat koniugatu poprzez zmieszanie 1 części koncentratu koniugatu z 10 częściami rozcieńczalnika koniugatu. Np. Dodać 0,1 ml koncentratu koniugatu do 1,0 ml rozcieńczalnika koniugatu. Powyższe wykonać 20 minut przed rozpoczęciem oznaczenia. Upewnić się, że rozcieńczony koniugat ma temperaturę pokojową. Unikać spienienia. Zużyć w ciągu 24 godzin.

Przygotować tylko wystarczającą ilość roboczego roztworu koniugatu, która jest wymagana do wykonania oznaczenia w danym dniu. Np. na 2 paski po 8 kubeczków wymagane jest rozcieńczenie 160 µl koncentratu koniugatu w 1,6 ml rozcieńczalnika.

Bufor myjący: Rozcieńczyć koncentrat buforu myjącego poprzez zmieszanie 1 części koncentratu z 19 częściami wody destylowanej. Na każde 8 kubeczków przygotować 25 ml rozcieńzonego buforu myjącego, tj. zmieszać 1,25 ml koncentratu buforu z 23,75 ml wody destylowanej. Do każdej serii badań przygotować świeży bufor myjący. Dodatkowa objętość buforu myjącego jest niezbędna do wstępnego przemycia automatycznej płuczki.

Płukanie jest punktem krytycznym procedury wpływającym na wyniki. Niedokładne płukanie wpływa na uzyskanie wyników o niskiej precyzji i fałszywie zawyżone odczyty absorbancji.

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. Diagnoza 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 nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikroplastyki. Zannotować 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 50µl odczynnika z przeciwciałami.
6. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
7. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roboczego roztworu koniugatu. Mieszać delikatnie przez 30 sekund.
8. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
9. 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.
10. Ręczne płukanie: Nappełnić kubeczki buforem myjącym, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl buforu. Wytarząca zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie buforem.
11. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
12. Płukanie 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. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie buforem myjącym. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
13. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
14. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
15. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
16. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
17. 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.

Próbki badane 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 opłaszczonych 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 wymieszać 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 odwrotności 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

Obliczyc średnią wartość absorbancji (A_{450}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrowym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach ng/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości T3 w ng/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.

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

WAROŚCI 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 będzie większa niż 1,5, a wartość kalibratora F jest mniejsza niż 0,75.

Zakres wartości prawidłowych całkowitego T3 uzyskany w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecznictwie otwartym wynosi 0,8 – 1,9 ng/ml.

Minimalne wykrywane testem PATHOZYME T3 stężenie całkowitego T3 wynosi 0,2 ng/ml.

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności testu PATHOZYME T3 jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyme Total T3 kit i Abbott AxSym Total T3 Kit użyto próbek o wartościach trijodotyroniny pomiędzy 0,32 a 5,9 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	67
Współczynnik korelacji	0.906
Wartość nachylenia krzywej	0.920
Punkt przecięcia z osią OY	- 0.229
Wartość średnia testem Omega	1.24 ng/ml
Wartość średnia testem Abbott	0.91 ng/ml

Do porównania testów Omega Pathozyme Total T3 kit i Monobind Total T3 Kit użyto próbek o wartościach trijodotyroniny pomiędzy 0.14 a 6.2 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	80
Współczynnik korelacji	0.993
Wartość nachylenia krzywej	1.004
Punkt przecięcia z osią OY	- 0.064
Wartość średnia testem Omega	1.21 ng/ml
Wartość średnia testem Monobind	1.13 ng/ml

W obu przypadkach testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- (1) Walker, W. H. O. Introduction: An approach to Immunoassay. Clin. Chem. 1977;23:384.
- (2) Kirkegaard, C., Friis, T. and Siersback-Nielsen, K. Acta Endocrinol. 1974;77:71.
- (3) Wisdom, G. B. Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 1976;22:1243.
- (4) Hoffenberg, R. Medicine. 1978;8:392.
- (5) Lieblisch, J., Utiger, R. D. J. Clin. Invest. 1972;51:1939.
- (6) Larson, P. R. Triiodothyronine: Review of Recent Studies of its Physiology and Pathophysiology in Man. Metabolism. 21,1073-1092(1972).

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

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

8086 ISSUE 8 Revised July 2010

©Omega Diagnostics Ltd., 2010. 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