

PATHOZYME® TOTAL THYROXINE (T4) ^{Ref} OD377

Enzimaimunoensaio (EIA)

para a detecção de Tiroxina (T4) no soro humano.

Conservar de 2°C a 8°C. NÃO CONGELAR.

Somente para Uso Diagnóstico in vitro.

INTRODUÇÃO

Tiroxina (3, 5, 3'-tetraiodotironina) ou T4 é o hormônio da tireóide mais frequentemente mensurada para o diagnóstico da função da tireóide. Ele é sintetizado nos folículos da glândula tireóide e tem sua influência primária no consumo de oxigênio e produção de calor em quase todos os tecidos. O hormônio também exerce um papel crítico no desenvolvimento do crescimento e maturação sexual dos mamíferos em crescimento. Mais de 90% do T4 transportado através da corrente sanguínea está ligado a proteínas plasmáticas, sendo que a principal proteína de ligação é a Globulina Ligante da Tiroxina (TBG). As proteínas de ligação secundárias são a Albumina Ligante da Tiroxina (TBPA) e a Pré-albumina.

O Hipotireoidismo primário resulta numa diminuição da produção de T4 pela glândula tireóide e consequentemente uma concentração baixa anormal de T4 circulante no sangue.

O Hipertireoidismo primário leva a um excesso de produção de T4 pela tireóide resultando em elevadas concentrações de T4 no sangue.

PATHOZYME T4 proporciona um método rápido e sensível para determinação do T4 em soro humano usando anticorpo monoclonal T4 altamente específico e uma solução marcada de enzimas T4 conjugada.

FINALIDADE DE USO

PATHOZYME T4 é um Enzimaimunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa de tiroxina T4 no soro humano. Somente para uso profissional.

PRINCÍPIO DO TESTE

As cavidades da microplaca são revestidas com anticorpos específicos anti-T4. Aplica-se o soro a testar. Adiciona-se o conjugado enzimático T4 / peroxidase que compete com o T4 do soro pelos sítios de ligações disponíveis na fase sólida.

Após a incubação, as cavidades são lavadas para a remoção de T4 ou conjugado não ligados e em seguida adiciona-se o substrato (TMB). A cor se desenvolverá somente nas cavidades onde a enzima estiver presente indicando a presença de T4 no soro. A reação da enzima é parada pela adição de ácido clorídrico diluído, a absorção é medida a 450nm.

Este teste foi calibrado segundo padrões internos, pois não existe padronização internacional para o mesmo.

CONTEUDOS

^{Ref}
OD377



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 1ml

Padrão referência: soro humano livre de T4. Pronto para uso. (incolor)

Cal B 20 ng/ml 1ml

Padrão referência: T4 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)

Cal C 50 ng/ml 1ml

Padrão referência: T4 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)

Cal D 100ng/ml 1ml

Padrão referência: T4 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)

Cal E 150ng/ml 1ml

Padrão referência: T4 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)

Cal F 250ng/ml 1ml

Padrão referência: T4 diluído em soro humano. Pronto para uso. (incolor)

Washbuf 20X 50ml

Tampão de Lavagem concentrado: tampão Tris contendo detergentes. (incolor)

Conj 11X 1.3ml

Conjugado T4HRP concentrado. T4 conjugado a peroxidase Pronto para uso. (incolor)

DIL Conj 11ml

Dilúente do conjugado: Tampão fosfato contendo estabilizantes. Solução de trabalho. (verde)

Subs TMB 11ml

Solução substrato (TMB) Pronto para uso. (incolor)

Soln Stop HCl 1M 11ml

Solução Stop: Ácido 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.
- Ponteiros descartáveis
- Papel absorvente
- Leitor de microplacas com filtro de 450 nm
- Papel gráfico
- Vidraria de laboratório limpa

PRECAUÇÕES

PATHOZYME T4 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, serem tratados como material de potencial risco biológico durante o uso e descarte. Não ingerir.

PATHOZYME T4 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 T4 é de Ácido Clorídrico sendo, portanto, corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

PATHOZYME T4 contém reagentes com 1% Proclin™ 300* como conservante, que pode ser tóxico caso seja ingerido. Em caso de contato, lavar com água corrente em abundância.

* 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 dilúente de conjugado. Adicionar 0,1ml de conjugado concentrado a 1,0ml de dilúente de conjugado. Este procedimento deve 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.

Preparar somente quantidade suficiente e de Solução de trabalho do conjugado para a realização dos testes requisitados no dia. Para 2 tiras com 8 cavidades, será necessária a diluição de 160µl de conjugado em 1,6ml de dilúente de conjugado.

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 os resultados deste teste. Lavagem insuficiente resultará em uma fraca precisão e leituras de absorbâncias falsamente elevadas.

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.

Tem se relatado, que os níveis de T4 são influenciados nas seguintes condições e tratamentos: níveis altos de TSH, gravidez, terapia com estrógenos, contraceptivos orais, heparina, fenitoína e propanolol.

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 a testar 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 a 2°C a 8°C.
4. Dispensar 25µl de padrões e soro teste em cada cavidade determinada.
5. Dispensar 100µl de solução de trabalho de conjugado em cada cavidade.
6. Homogeneizar completamente por 30 segundos.
7. Incubar por 60 minutos a temperatura ambiente de 20°C a 25°C
8. 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.
9. 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. Bater as cavidades sobre um papel absorvente. Lavar as cavidades vazias 5 vezes.
10. Bater as cavidades sobre um papel absorvente ou papel toalha para remover todo o resíduo de água.
11. 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.
12. Dispensar 100 µl da Solução Substrato em cada cavidade e homogeneizar suavemente por 5 segundos.
13. Incubar no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
14. Interromper a reação pela adição de 100 µl da Solução de Bloqueio em cada cavidade.
15. Homogeneizar suavemente por 30 segundos para certificar-se que a cor azul mudará completamente para amarelo
16. 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 ponteiras 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 pipetagens 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 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 T4 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 DO450 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.

Em uma localização geográfica, foi realizados um estudo com **PATHOZYME T4** em 200 pacientes eutireóidicos, com valores normais de T4 compreendidos num intervalo de 50 a 130ng/ml. Esse intervalo corresponde ao sugerido por outros fabricantes comerciais. Recomenda-se que os laboratórios ajustem os valores para refletir as diferenças específicas populacionais e geográficas dos pacientes. O mínimo detectável de T4 com **PATHOZYME T4** é estimado em 4ng/ml.

AVALIAÇÃO DOS DADOS

Calibrado em relação aos maiores competidores e a padrões internos. O coeficiente de variação do **PATHOZYME T4** é menor ou igual a 10%

Uma avaliação entre o kit Omega **PATHOZYME T4** Total e o kit Abbott AxSym T4 Total para amostras com níveis entre 13 e 245 ng/ml forneceram os seguintes dados :

Numero de amostras	82
Coefficiente de correlação	0,954
Inclinação	0,914
Intercepção	1,049
Omega	99 ng/ml
Abbott	101ng/ml

Esses kits demonstraram uma boa correlação

REFERÊNCIAS

- (1) **Skelly, D., Brown, L., and Besch, P.** Radioimmunoassay. Clin. Chem. 19:146;1973.
- (2) **Wistom, G. B.** Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem. 22:1243;1976.
- (3) **Schall, R.F., Fraser, A.S., Hansen H.W., Kern, C.W. and Tenoso, H.J.** Clin. Chem. Vol. 24, No. 10, pages 1801-1804, 1978
- (4) **Larsen, P.R., Ingbar, S.H.,** William's Text Book of Endocrinology, Wilson JD and Foster eds., Philadelphia, Sanders Company, 1992, Section 3, Thyroid, Chapter 8, The Thyroid Gland, P. 358-487
- (5) **Robbins, J.** Radioassay and Thyroid Gland. Metabolism. 22:1021;1973.

PROCEDIMENTO RÁPIDO

1. Dispense 25µl do soro teste ou Padrão e 100µl de solução de trabalho de conjugado em cada cavidade e misture completamente por 30 segundos.
2. Incubar por 60 min. a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
3. Descartar o conteúdo das cavidades e lavar 5 vezes com Tampão de lavagem.
4. Adicionar 100µl de Solução Substrato em cada cavidade. Misturar gentilmente por 5 segundos.
5. Incubar no escuro por 20 min. a temperatura ambiente (20°C a 25°C).
6. Adicionar 100µl de Solução Bloqueadora em cada cavidade e misturar gentilmente por 30 segundos.
7. Ler a Densidade Óptica imediatamente (no máximo 10 min.) usando um leitor de microplaca com filtro de 450 nm.

8087 ISSUE 8A Reviewed July 2015 PORTUGUESE
© Omega Diagnostics Ltd., 2015



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