

PATHOZYME® FREE THYROXINE Ref OD467

Immunoenzymatyczny test do ilościowego oznaczania FT4 w ludzkiej surowicy. Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ. Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

L-tyroksyna (T4) lub inaczej 3,5,3',5'-tetrajodotyronina jest najczęściej oznaczanym hormonem tarczycowym wykorzystywanym w diagnostyce tarczycy. T4 ma zasadnicze oddziaływanie na syntezę białek, rzeczywiste zużycie tlenu w tkankach, jak również ma istotne znaczenie w czasie wzrostu, rozwoju i dojrzewania płciowego.

T4 jest syntetyzowane przez tarczycę i wydzielane bezpośrednio do krwi. Tu ulega przyłączeniu do białek osocza, aby w tej postaci móc być transportowanym do komórek. Głównym białkiem nośnikowym jest globulina wiążąca tyroksynę (TBG), co stanowi 80% wiążącą tyroksynę. Innymi nośnikami białkowymi są prealbumina wiążąca tyroksynę i albumina wiążąca tyroksynę. Większość T4 występującej w surowicy wiąże się z powyższymi białkami transportowymi, a zaledwie, bo 0,03% występuje w formie wolnej i wykazuje bezpośrednio oddziaływanie na komórki. Ta forma, czyli wolne T4 (FT4), reprezentuje biologicznie aktywną formę hormonu, z tego też powodu pomiar stężenia FT4 brany jest pod uwagę jako wskaźnik u pacjentów z problemami tarczycowymi.

Wskaźnikiem pierwotnej niedoczynności tarczycy jest obniżona produkcja T4 przez tarczycę, co w konsekwencji objawia się patologicznie niskim stężeniem FT4 w krążącej krwi. Pierwotna nadczynność tarczycy prowadzi do nadmiernej produkcji T4 przez tarczycę, efektem czego jest wzrost stężenia FT4.

Stężenie całkowitego T4 w surowicy jest zależne od poziomu krążącego białka TBG, jak również od stanu tarczycy u badanego pacjenta. Na poziom TBG mogą wywierać wpływ niektóre leki, hormony sterydowe, ciąża i różne choroby nie związane z tarczycą. W testach wcześniejszych generacji służących do diagnostyki funkcji tarczycy, efekt zmian stężenia TBG był określany po wyliczeniu Indeksu Wolnej Tyroksyny (FTI). Współczynnik FTI jest produktem stężenia całkowitego T4 i zdolności wychwytywania (TU) produktów tarczycy, który określa liczbę dostępnych miejsc wiążących na TBG. W ten sposób wymagane jest określenie dwóch oddzielnych parametrów (całkowitego T4 i TU), co z kolei dostarcza lepszych wskaźników dotyczących statusu tarczycy niż jedynie całkowite T4. Testy T4 przeznaczone są do bezpośredniego odzwierciedlenia istniejącej w surowicy równowagi pomiędzy T4 i T4 związanego z TBG. Metody te przyznają się do opracowania testów FT4, które pozwalają na określenie statusu tarczycy przy użyciu tylko jednego parametru.

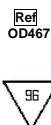
PRZEZNACZENIE

PATHOZYME FREE T4 jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczania wolnej tyroksyny (FT4) w ludzkiej surowicy. Do użytku w laboratorium.

ZASADA

Test FT4 jest testem, w którym wykorzystano kompetycyjną metodę immunoenzymatyczną na fazie stałej. Surowce badanych pacjentów, standardy i koniugat enzymatyczny są dodawane do kubeczków opłaszczonych monoklonalnymi przeciwciałami T4. 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 FT4 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 FT4 w próbce. Test wykalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU



12 x 8 wells x 1

Microtitre Plate				
Dzielona mikropłytką z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.				
Cal	A	0 pg/ml		1ml
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona wolnego T4. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	B	Level as stated on vial		1ml
Standard referencyjny: wolne T4 rozcieńczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	C	Level as stated on vial		1ml
Standard referencyjny: wolne T4 rozcieńczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	D	Level as stated on vial		1ml
Standard referencyjny: wolne T4 rozcieńczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	E	Level as stated on vial		1ml
Standard referencyjny: wolne T4 rozcieńczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	F	Level as stated on vial		1ml
Standard referencyjny: wolne T4 rozcieńczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Conj				10.5ml
T4 HRP koniugat: T4 koniugat znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Zielony)				
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 i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Papier absorbujący.
Czynnik mikroplytek z filtrem 450 nm.
Papier miilimetry.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw **PATHOZYME FREE T4** zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV i II – 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 T4** 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 T4** zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używać z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu splukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu **PATHOZYME FREE T4** zawierają 1% Proclin™ 300* jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu splukać 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.

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

- Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
- Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikropłytki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
- Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
- Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 50µl standardów i próbek badanych.
- Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu. Mieszać delikatnie przez 30 sekund.
- Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
- 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 odkażający.
- Ręczne płukanie: Napelnąć kubeczki wodą destywowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyć puste kubeczki 5-krotnie.

9. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
10. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozjuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odkażający. Przemyc puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzanie kubeczkami na papierze absorbcyjnym lub papierowym ręczniku.
11. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu.
12. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20 °C - 25°C).
13. 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 mikroplatek 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 mikroplatyki (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 mikroplatyki 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 zanieczyszczają roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

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

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2 °C - 8°C), powinny być ściśle 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 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 FT4 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 kalibratora F jest mniejsza niż 0,75.

Zakres wartości prawidłowych FT4 uzyskany w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w lecznictwie otwartym wynosi 8 – 22 pg/ml.

Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME FREE T4** stężenie wolnej tyroksyny wynosi 0,5 pg/ml.

Substancja	Interferencja (%) równoważna w 100µg/ml tyroksyny
d - Trójiodotyronina	0.0150
l - Trójiodotyronina	0.0300
Jodotyrozyna	0.0001
Dijodotyrozyna	0.0001
Dijodotyronina	0.0001

OCENA WYNIKÓW

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

Współczynnik zmienności dla testu **PATHOZYME FREE T4** jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyme Free T4 kit i probówkowego testu radioimmunologicznego użyto próbek o wartościach wolnej tyroksyny pomiędzy 1 a 80 pg/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	85
Współczynnik korelacji	0.978
Wartość nachylenia krzywej	0.952
Punkt przecięcia z osią OY	0.1
Wartość średnia testem Omega	15 pg/ml
Wartość średnia metodą radioimmunologiczną	14 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., Nyström, 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. **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 tyroksyny i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
3. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 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°C - 25°C).
7. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
8. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8119 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