

# PATHOZYME® FREE THYROXINE **Ref** OD467

## Enzima Imunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa de fT4 em soro humano.

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

### Apenas para diagnóstico in vitro.

#### INTRODUÇÃO

A L-Tiroxina (T4) ou 3,5,3',5'-tetraiodotironina é uma das hormonas mais comuns no diagnóstico da função da tireóide. A T4 tem principal influencia na síntese das proteínas e consumo de oxigénio em praticamente todos os tecidos, sendo também importante no crescimento, desenvolvimento e maturação sexual.

A T4 é sintetizada pela glândula tireóide e é secretada na circulação sanguínea. Aí, a T4 liga-se às proteínas séricas para o seu transporte às células. A proteína de transporte principal é a globulina ligada à tiroxina. (TBG) Esta é responsável por 80% do T4 ligado. A tiroxina ligada a prealbumina e albumina são outras proteínas ligadas às hormonas da tireóide. A maior parte da T4 séricas está ligada a estas proteínas de transporte deixando na forma livre somente cerca de 0,03% para exercer o seu efeito nas células. É o T4 livre (fT4) que representa a fracção metabolicamente activa. Por esta razão, a determinação da concentração de fT4 é considerada um indicador do estado funcional da tireóide do doente. O hipotireoidismo primário resulta numa baixa produção de T4 pela glândula da tireóide, dando origem também a uma concentração circulante muito baixa de fT4 no sangue. O hipertireoidismo primário leva a uma produção excessiva de T4 na tireóide o que resulta em elevadas concentrações de T4. As concentrações de T4 total no soro dependem do nível de TBG circulante, bem como do estado de saúde do doente. A concentração de TBG pode ser afectada por certo tipo de drogas, esteróides, hormonas, gravidez e por outras doenças que relacionadas com a tireóide. A primeira geração de testes da função da tireóide ultrapassava a questão do efeito provocado pela concentração variável da TGB através do cálculo do Índice de Tiroxina Livre. (FTI) Este FTI é produto da concentração de T4 total e do uptake da tireóide (TU), os quais avaliam qual o número de locais de ligação disponíveis na TBG. Esta abordagem requer que sejam levadas a cabo duas determinações, (T4 total e TU) contudo, esta é a mais indicada na avaliação do estado da tireóide do que somente a determinação de T4 total. Os testes de fT4 têm como objectivo reflectir o equilíbrio existente no soro entre as T4 e as T4 ligadas-TGB. Estes métodos, incluindo os testes fT4, conseguem evidenciar o estado da tireóide num só teste.

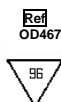
#### INTERESSE CLINICO

**PATHOZYME FREE T4** é um enzima imunoensaio (EIA) para a determinação quantitativa de Tiroxina livre (fT4) em soro humano.

#### PRINCIPIO DO TESTE

O teste fT4 é um enzima imunoensaio de competição de fase sólida. As amostras, os calibradores e o Conjugado são adicionados aos poços revestidos com anticorpos monoclonais T4. Após a incubação à temperatura ambiente, os poços são lavados 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. Isto indica a ausência de fT4. A reacção da enzima é parada pela adição de ácido clorídrico diluído, a absorção é medida a 450nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de enzima presente na amostra e é inversamente relacionada com a quantidade de fT4 não marcado na amostra. Este teste foi calibrado de acordo com as nossas referências-padrão. Não existem ainda referências internacionais para este teste.

#### CONTEÚDOS



<b>Microtitre Plate</b>	12 x 8 wells x 1
Poços em tiras fracçãoáveis revestidos com anticorpos específicos dentro de um invólucro de alumínio com excicante.	
<b>Cal A</b>	0 pg/ml 1 ml
Calibrador de Referência: Soro humano sem T4 livre. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Cal B</b>	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T4 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Cal C</b>	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T4 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Cal D</b>	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T4 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Cal E</b>	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T4 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Cal F</b>	Level as stated on vial 1ml
Calibrador de Referência: T4 livre diluído em soro humano. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Conj</b>	10.5ml
Conjugado T4 HRP: T4 conjugado a Peroxidase. Pronto a usar. (verde)	
<b>Subs TMB</b>	11ml
Solução Substrato: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidina em tampão citrato. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Soln Stop HCl 1M</b>	11ml
Solução Stop: Ácido Clorídrico diluído em água purificada. Pronto a usar. (Incolor)	
<b>Folheto de Instruções e Folha de registo de dados EIA</b>	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 T4** 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 T4** 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 T4** é constituída por Ácido Clorídrico diluído sendo este corrosivo. Manusear com cuidado. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

Os reagentes **PATHOZYME FREE T4** contém 1.0% de Proclin 300™\* como conservante, este poderá ser tóxico se ingerido. Em caso de contacto, enxaguar bem com água abundante.

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

#### CONSERVAÇÃO

O kit deve 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 hemolisadas, 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 Zaida de Sódio como conservante. Este pode inibir o sistema da enzima pericidas.

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 calibradores 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 tiroxina em todos os poços. Agitar a microplaca suavemente durante 30 segundos.
- 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.

9. Passar os poços em papel absorvente ou em toalhas de papel para remover todos os resíduos de água.
10. Lavagem Automática: Verificar se cada poço tem 300µl de água destilada e que o desinfetante apropriado é adicionado ao frasco de colecta de desperdício. Após a lavagem, retirar fluido em excesso passando os poços por papel absorvente ou toalhas de papel para remover os resíduos de líquido.
11. Pipetar 100µl de Substrato a todos os poços.
12. Incubar no escuro durante 20 minutos à temperatura ambiente (20°C to 25°C).
13. Parar a reacção adicionando 100µl de Solução de Paragem a cada poço.
14. Agitar suavemente durante 30 segundos. É importante certificar que a cor azul muda por completo para uma cor amarela.
15. 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.

#### CÁLCULO DOS RESULTADOS

Determinar a média das absorvâncias ( $A_{450}$ ) para cada conjunto de padrão 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 estar no eixo Y e as concentrações no eixo X. Utilizar os valores médios das absorvâncias de cada amostra para determinar a concentração de FT4 correspondente em pg/ml da 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.

#### 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.

Com base num estudo feita numa amostragem de pessoas saudáveis, o intervalo de referência do FT4 é de 8 - 22 pg/ml. A concentração mínima de FT4 detectável pelo kit PATHOZYME FREE T4 foi estimado em 0.5 pg/ml.

Substância	Reacções Cruzadas ( % ) equivalentes a 100µg/ml de Tiroxina
d - Triiodotironina	0.0150
l - Triiodotironina	0.0300
Iodotirosina	0.0001
Diiodotirosina	0.0001
Diiodotironina	0.0001

#### AValiação

O coeficiente da variação do PATHOZYME FT4 é menor ou igual a 10%.

Os dados seguintes foram gerados de uma avaliação entre o kit Pathozyne Free T4 da Omega e um radioimunoensaio de método semelhante em amostras com níveis entre 1 e 80 pg/ml.

Numero de Amostras	85
Coefficiente de Correlação	0.978
Declive	0.952
Intercepção	0.1
Média com o kit da Omega	15 pg/ml
Média com o Radioimunoensaio	14 pg/ml

Os resultados apresentaram boa correlação entre os dois kits.

#### REFERENCIAS

1. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry 2<sup>nd</sup> 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. 3<sup>rd</sup> 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 Gieyda, 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.

#### RESUMO DA EXECUÇÃO DO TESTE

1. Pipetar 50µl dos calibradores ou de amostras 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 to 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.

8119 ISSUE 5B 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 ISO13485 CERTIFIED COMPANY