

# PATHOZYME® TOTAL THYROXINE (T4) <sup>Ref</sup> OD377

## Immunoenzymatyczny test (EIA) do oznaczania tyroksyny (T4) w ludzkiej surowicy.

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

### Do diagnostyki "in vitro".

#### WPROWADZENIE

Tyroksyna (3,5,3',5' – tetrajodotyronina) lub w skrócie T4 jest najczęściej oznaczanym hormonem tarczycowym wykorzystywanym w diagnostyce tarczycy. Hormon ten syntetyzowany jest w pęcherzykach gruczołu tarczycowego i ma zasadnicze oddziaływanie na zużycie tlenu i rzeczywiste wytwarzanie ciepła w tkankach. Ma również istotne znaczenie w czasie rozwoju i dojrzewania płciowego u ssaków. Ponad 99,9% T4 transportowane jest prądem krwi i łączy się z białkami osocza. Głównym nośnikiem białkowym jest globulina wiążąca tyroksynę (TBG), w mniejszym stopniu tyroksyna wiąże się z albuminą i prealbuminą. Pierwotna niedoczynność tarczycy objawia się spadkiem produkcji T4 przez gruczoł tarczycowy, konsekwencją czego jest patologicznie niskie stężenie T4 w krążącej krwi. Pierwotna nadczynność tarczycy prowadzi do nadmiernej produkcji T4, efektem czego jest wzrost stężenia T4 we krwi.

PATHOZYME T4 jest testem wykorzystującym szybką i czułą metodę do określenia poziomu T4 w ludzkiej surowicy z zastosowaniem wysoko specyficznych, monoklonalnych przeciwciał T4 i roztworu koniugatu T4 znakowanego enzymem.

#### PRZEZNACZENIE

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

#### ZASADA TESTU

Kubeczki mikropłytki opłaszczane są specyficznymi przeciwciałami anti-T4. Do testu należy użyć surowicy. Tyroksyna obecna w badanej surowicy współzawodniczy o miejsce wiążące na fazie stałej po dodaniu T4 znakowanego peroksydazą chrzanową (koniugat). Po inkubacji kubeczki są płukane wodą w celu usunięcia nie związanej T4 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 T4 w badanej próbce. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej następuje po dodaniu rozcieńczonego 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

<sup>Ref</sup>  
OD377



Microtitre Plate			12 x 8 wells x 1	
Dzielona mikropłytką z kubeczkami opłaszczonymi specyficznymi przeciwciałami, umieszczona w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.				
Cal	A	0 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona T4. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	B	20 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: T4 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia.				
Cal	C	50 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: T4 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	D	100 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: T4 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	E	150 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: T4 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Cal	F	250 ng / ml	1 ml	
Standard referencyjny: T4 rozpuszczone w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Washbuf	20X		50 ml	
Koncentrat buforu myjącego: buforowany roztwór Tris zawierający detergenty. (Bezbarwny)				
Conj	11X		1.3 ml	
T4 HRP koniugat koniugatu: koniugat T4 znakowany peroksydazą chrzanową. (Bezbarwny)				
DIL	Conj		12 ml	
Rozcieńczalnik koniugatu: Buforowany roztwór fosforanowy zawierający stabilizatory białkowe. Roztwór roboczy. (Zielony)				
Subs	TMB		11 ml	
Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)				
Sołn	Stop	HCl	1 M	11 ml
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: 50µl, 100µl, 200µl i 1000µl.  
Końcówki do pipet.  
Papier absorbcyjny.  
Czytnik mikropłytek z filtrem 450 nm.  
Papier milimetry.  
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

#### ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME T4 zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV I 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 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 T4 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 T4 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 świeżej surowicy.

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 azydku sodowego 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 - 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 rozcieńczonego 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. Żadne modyfikacje 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.

Zaobserwowano wpływ następujących czynników i środków leczniczych na poziom T4: wysoki poziom TSH, ciąża, terapia estrogenowa, doustne środki antykoncepcyjne, heparyna, fenytoina, propranololu.

## 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 mikropłytki. Zanotować 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 25µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roboczego roztworu koniugatu.
6. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten etap jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 60 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. 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.
9. Ręczne płukanie: Napelnić kubeczki buforem myjącym, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl buforu. Wyrzucić zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemycić puste kubeczki 5-krotnie buforem.
10. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
11. 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.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
14. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
15. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
16. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikropłytka 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 mikropłytki (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 mikropłytki 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 odzwierciedlenia 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

Obliczyć 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 T4 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. Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu 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. **PATHOZYME T4** użyto do przeprowadzenia badań u 200 pacjentów z eutyreozą pochodzących z tej samej strefy geograficznej i z wynikami w zakresie wartości prawidłowych od 50 do 130 ng/ml. Wartości te korespondują z tymi jakie są sugerowane przez innych komercyjnych producentów. Zalecane jest aby każde laboratorium ustaliło własne zakresy wartości prawidłowych uwzględniających regiony geograficzne i różnorodność populacji, określone dla danej grupy pacjentów. Minimalne wykrywane testem **PATHOZYME T4** stężenie tyroksyny wynosi 4 ng/ml.

## OCENA WYNIKÓW

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

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

Do porównania testów Omega Pathozyne Total T4 i Abbott AxSym Total T4 kit użyto próbek o wartościach tyroksyny pomiędzy 13 a 245 ng/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	82
Współczynnik korelacji	0.954
Wartość nachylenia krzywej	0.914
Punkt przecięcia z osią OY	1.049
Wartość średnia testem Omega	99 ng/ml
Wartość średnia testem Abbott	101 ng/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

## PIŚMIENNICTWO

- (1) Skelley, 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.

## SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

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

8087 Issue 8A Revised July 2015.  
© Omega Diagnostics Ltd 2015. 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