

## INTENCIÓN DE USO

El kit T4 ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de Tiroxina Total (T4) en suero o plasma humano.

## RESUMEN Y APLICACIÓN

La determinación de T4 es un factor importante en el diagnóstico de Hipotiroidismo e Hipertiroidismo. Los niveles de T4 decrecen en pacientes con Hipotiroidismo y se incrementan en pacientes con Hipertiroidismo. Los individuos Eurotiroideos presentan niveles de T4 normales.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

T4 es un método Elisa en fase sólida competitiva. Las muestras, el conjugado de trabajo T4-HRP y la solución de anticuerpo T4-Biotina, se añaden a los pocillos designados recubiertos con Streptavidina. El T4 en el suero del paciente compite por los lugares de unión con un conjugado enzimático T4 (HRP). El T4 no unido, así como el exceso de conjugado enzimático T4, son lavados por la solución de lavado. Tras la adición del sustrato, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de T4 en las muestras. Una curva estándar se prepara sobre la intensidad del color a la concentración de la T4.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con estreptavidina	12x8x1
2. Estándares de T4: 6 viales (listos para su uso)	0.5ml
3. Solución Anti T4 – Biotina: 1 frasco (listo para su uso)	7ml
4. Conjugado T4 - HRP: 1 frasco (concentrado 11X)	0.7ml
5. Diluyente: 1 frasco (listo para su uso)	7ml
6. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12ml
7. Solución de Frenado: 1 botella (listo para su uso)	12ml
8. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25ml

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

## ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede resultar en datos no válidos.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamientos de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **T4 SOLUCION DE ENZIMA CONJUGADA:** Prepare una dilución 1:11, diluyendo la Enzima Conjugada T-4 con el Buffer Conjugado en un contenedor adecuado. Por Ejemplo: Diluya 160 µl del Conjugado con 1.6 ml de Buffer para 16 pozos (con un ligero exceso de solución). Este reactivo debe ser utilizado dentro de las 24 horas para el máximo funcionamiento de la prueba. Conservar a 2-8°C.  
Formula General:  
Cantidad de Buffer requerida = Cantidad de pocillos X 0.1  
Cantidad de Solución de Enzima Conjugada necesaria = Cantidad de Pocillos X 0.01  
Ejemplo= 16 x 0.1 = 1.6ml para el total de Buffer Conjugado, 16 x 0.01 = 0.16ml (160µl) para la Solución de Enzima Conjugada.
2. **SOLUCIÓN DE LAVADO:** Preparar solución de lavado a 1x adicionando 475ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25ml a 20x). Guarde a temperatura ambiente (18°-26°C).

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°- 26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar para realizar el ensayo por muestra. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
2. Agregue 50 µl de estándares de T4, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 50 µl de la solución T4 de enzima conjugada en todos los pocillos. (Ver preparación del reactivo).
4. Agregue 50 µl de la solución Anti T4 - Biotina en todos los pocillos.
5. Agite suavemente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar los reactivos.
6. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18-26°C).
7. Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
8. Agregue 100 µl de sustrato TMB en todos los pocillos.
9. Cubra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Agite gentilmente para facilitar el mezclado de la solución por 15-20 segundos.
11. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

### CÁLCULO DE RESULTADOS

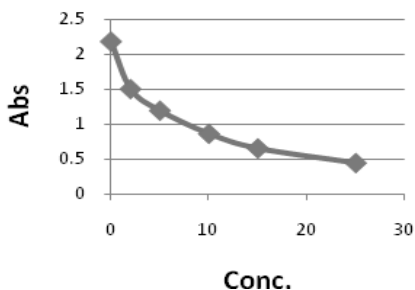
La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Compruebe el valor estándar de T4 en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de verificar el valor de cada kit. Véase el ejemplo de la norma adjunta.
2. Para construir la curva estándar, trazar la absorbancia para el estándar de T4 (eje vertical) frente a las concentraciones estándar de T4 (eje horizontal) en un papel gráfico lineal. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
3. Lea la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida. Registre el valor de cada control o muestra desconocida.

#### Ejemplo de la curva estándar:

	OD 450 nm	Conc. µg/dL
Std 1	2.18	0
Std 2	1.50	2
Std 3	1.19	5
Std 4	0.86	10
Std 5	0.65	15
Std 6	0.44	25

#### Standard Curve



### VALORES ESPERADOS

Fue llevado a cabo un estudio sobre la población adulta Eutiroidea a fin de determinar valores esperados para el sistema de análisis de T4. El valor medio, el desvío estándar y el rango esperado son presentados en la siguiente tabla.

	HOMBRE	MUJER
MEDIA	7.6	8.2
DESV. STD.	1.6	1.7
RANGO	4.4-10.8	4.8-11.6

### LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
2. No utilice azida sodica como conservador ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

### REFERENCIAS

1. Agharanya JC. Clinical usefulness of ELISA technique in the assessment of thyroid function. West Afr J Med 1990;9(4):258-63.
2. Frank JE; Faix JE; Hermos RJ; Mullaney DM; Rojan DA; Mitchell ML; Klein RZ Thyroid function in very low birth weight infants: effects on neonatal hypothyroidism screening. J Pediatr 1996; 128(4):548-54.
3. Shimada T; Higashi K; Umeda T; Sato T. Thyroid functions in patients with various chronic liver diseases. Endocrinol Jpn 1988; 35(3):357-69.
4. Thakur C; Saikia TC; Yadav RN. Total serum levels of triiodothyronine (T3) thyroxine (T4) and thyrotropine (TSH) in school going children of Dibrugarh district: an endemic goitre region of Assam. Indian J Physiol Pharmacol 1997; 41(2):167-70.