

INDICACIONES DE USO

Inmunoensayo para la cuantificación de tiroxina libre (T4 libre) en suero o plasma. Agente de diagnóstico in vitro. Para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

DESCRIPCIÓN

Más del 99% de T4 circulante en sangre se encuentra unido a proteínas de transporte, principalmente la Globulina fijadora de Tiroxina (TBG). Sin embargo, solo la porción libre (no unida) de T4 es responsable de acción biológica. Además, las concentraciones de las proteínas de transporte se ven alteradas en diversas condiciones clínicas, por ejemplo, el embarazo. En el normal funcionamiento de la tiroides, mientras las concentraciones de transportadores de proteínas se alteran y los niveles de T4 total cambian, los niveles de T4 libres se mantienen constantes. Así, las mediciones de T4 libre resultan más confiables y tienen mayor correlación con la condición clínica que los niveles de T4. El aumento en niveles de T4 total asociados al embarazo, uso de anticonceptivos orales y terapias de estrógeno, resultan en altos niveles de T4 total, mientras que la concentración de T4 Libre permanece básicamente sin cambios. Este ensayo es un método Elisa en fase sólida competitiva.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

FT4 ELISA Calbiotech es un método Elisa en fase sólida competitiva. Las muestras, la solución de anticuerpo T4-Biotina y el conjugado enzimático de T4 Libre, se añaden a los pocillos designados recubiertos con estreptavidina. El T4 Libre en el suero del paciente compete por los lugares de unión con el conjugado enzimático T4. El T4 no unido, así como el exceso de conjugado enzimático de T4 Libre, son lavados por la solución de lavado. Tras la adición del sustrato, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de T4 Libre en las muestras. Una curva estándar se prepara sobre la intensidad del color a la concentración de la T4 Libre.

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. Micropozos recubiertos con estreptavidina	12x8x1
2. Estándares de T4 Libre: 6 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Solución Anti T4 – Biotina	7 ml
4. T4 enzima conjugada concentrada: 1 vial	7 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Solución de paro: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Buffer de lavado concentrado (20X)	25 ml
8. Inserto	1
9. Certificado de análisis	1

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 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C - 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 riesgo biológico de los materiales: 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 pueda 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 una temperatura de entre 2°C a 8°C por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento 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

Preparar la solución de lavado a 1X añadiendo el contenido de la botella (25 mL 20X) a 475 mL de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

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

1. Corte el número de pozos a utilizar para que realizar el ensayo. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
2. Agregue 25 µl de estándares de T4 Libre, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 50 µl del Conjugado Enzimático T4 Libre en todos los pocillos.
4. Agregue 50 µl de la solución Anti T4 - Biotina en todos los pocillos.
5. Agite gentilmente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar los reactivos.
6. Cubra e incuba 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 1X. Golpee la placa sobre papel absorbente.
8. Agregue 100 µl de sustrato TMB en todos los pocillos.
9. Cubra e incuba 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.
11. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa en un plazo no mayor de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

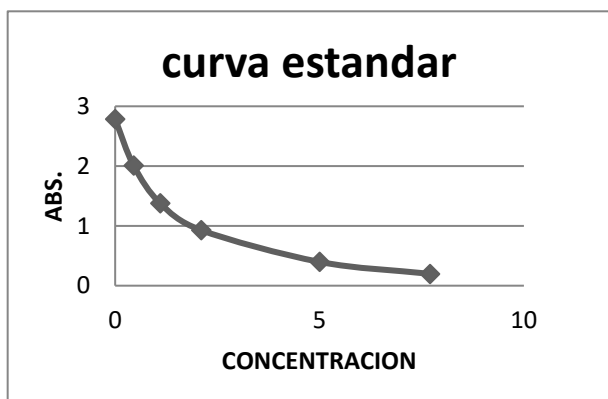
CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Compruebe el valor del estándar de T4 Libre en el vial del estándar. Este valor puede variar de un lote a otro. Asegúrese de revisar el valor en cada kit. Véase el ejemplo de estándar adjunto.
2. Para construir la curva estándar, trace la absorbancia de los estándares de T4 Libre (eje vertical) frente a concentraciones normales de T4 Libre (eje horizontal) en un papel de grafica linear. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
3. Lea la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida de la curva. Registre el valor de cada control o muestra desconocida.

Ejemplo de curva estándar

	OD 450 nm	Conc. pg/ml
Std 1	2.785	0
Std 2	2.011	0.45
Std 3	1.378	1.10
Std 4	0.929	2.10
Std 5	0.398	5.00
Std 6	0.198	7.70



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de T4 Libre fueron establecidos por la CBI y pueden ser utilizados únicamente como guía:

Clasificación	ng/ml
Adultos	0.8 - 2.0
Embarazadas	0.76 - 2.24

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 ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 128 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.95	0.925	0.15

2. Precisión: Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media no/dl	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	16	0.550	0.061	10.98
2	16	1.740	0.074	4.26
3	16	3.250	0.106	3.25

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media no/dl	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	10	0.480	0.052	10.81
2	10	1.410	0.085	6.01
3	10	3.490	0.279	7.90

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba fue al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	Media + 2SD
Zero Standard	0.314 ng/ml

4. Especificidad:

La reactividad cruzada del anticuerpo tiroxina, utilizado en Tiroxina Libre, a sustancias seleccionadas fue evaluada agregando grandes cantidades de la sustancia que interfería a una matriz del suero. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de sustancia de interferencia y la dosis de tiroxina necesaria para desplazar la misma cantidad de conjugado.

Esteroides	Reactividad	Concentración
l-Tiroxina	1.0000	-
d-Tiroxina	0.9800	10 µg/mL
Iodotirosina	0.0001	100 µg/mL
Diiodotirosina	0.0001	100 µg/mL
Diiodotironina	0.0001	100 µg/mL
Fenilbutazona	N/D	10 µg/mL
Salicilato de Sodio	N/D	10 µg/mL

REFERENCIAS

1. Baker, S.B., "determination of protein bound iodine", *Jornal Biological Chemistry* 173, 175. (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine", *Jornal Endocrinol* 33, 865. (1971).
3. Young, D.S., Pestanger, L.C, and Giberman, U., "Effect of Drugs on Clinical Laboratory Tests", *clinical chemistry* 21, 3660. (1975).
4. Sterling, L., *Diagnosis and Treatment of thyroid disease*, Cleveland, CRC press P.19-51. (1975).
5. Halper, E.P. and Bordens RW. "Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay. Determination of free thyroxine".
6. Stjernholm, MR, Alsever, RN and Rudolph, MC. "Thyroid function test in diphenylhydantoin-treated patients", *clin. Chem...* vol. 21, 1388-1392. (1977)
7. Nelson, J.C. and Wilcox, RB. "Analytical performance of free and total thyroxine assays". *Clin. Chem.* Vol. 42, 146-154 (1996).
8. Midgeley John, EM. "Direct and Indirect free thyroxine assay methods. Theory and practice" *clin. Chem.* Vol. 47, 1353-1363. (2001).
9. Bayer, MF and McDougall, IR. "Radioimmunoassay of free thyroxine in serum. Comparison with clinical finding and results of conventional thyroid-function tests" *clin. Chem.* Vol. 26, 1186-1192. (1980).
10. Anthony, GW. Jackson, RA ET. al. "Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor", *Clin. Chem* vol. 43, 957-962. (1997),
11. Wosillait, WD. "A theoretical analysis of the distribution of thyroxine among site on the thyroxine binding globulin, thyroid binding prealbumin and serum albumin ". *RES. Comm. Chem. Patho-pharmacology* 16, 541-548. (1977).