

### INTENCIÓN DE USO

El ensayo Autobio T4 clia está diseñado para la determinación cuantitativa de la concentración de tiroxina (T4) en suero humano.

### RESUMEN Y APLICACIÓN

La tiroxina-tetrayodo-L-tironina (T4) es la principal hormona producida por la glándula tiroides. Tiene un peso molecular de 777 Daltons y es sintetizada por la yodación de los residuos de tirosina en la tiroglobulina. La escisión proteolítica de la tiroglobulina folicular libera T4 en la sangre. Más del 99% de la T4 se une reversiblemente a 3 proteínas plasmáticas en la sangre: la globulina fijadora de tiroxina (TBG) se une un 70%, la pre-albúmina de unión a tiroxina (TBPA) se une un 20%, y a la albúmina se une el 10%. Aproximadamente el 0,03% de T4 se encuentra en estado libre (no unido) en la sangre todo el tiempo. Las enfermedades que afectan la función tiroidea pueden presentar una amplia gama de síntomas confusos. La medición del T4 total por inmunoensayo es la prueba más fiable y práctica disponible para determinar la presencia de trastornos de la tiroides en los pacientes. Los niveles elevados de T4 se han encontrado en hipertiroidismo debido a Enfermedad de Graves, de Plummer y en la tiroiditis aguda y subaguda. Los niveles bajos de T4 han sido asociados con hipotiroidismo congénito, mixedema, Tiroiditis crónica (enfermedad de Hashimoto) y algunas anomalías genéticas.

### PRINCIPIO DEL ENSAYO

En el T4 CLIA, una cierta cantidad de anticuerpo anti-T4 se recubre sobre pocillos de microtitulación. Una cantidad medida de suero del paciente, y una cantidad constante de T4 conjugado con peroxidasa de rábano picante se añaden a los pocillos de microtitulación. 8-ailino-1-naftaleno sulfonato (ANS) se utiliza para desplazar T4 a partir de proteínas para permitir la medición de T4 circulante total. Durante la incubación, T4 y T4 conjugado compiten por los sitios de unión limitados en el anticuerpo anti-T4. Después de 60 minutos de incubación a 37°C los pocillos se lavan con solución de lavado. Después de la adición del sustrato, la actividad de peroxidasa de rábano unida en los pocillos después se sometió a ensayo mediante reacción de quimioluminiscencia. La unidad de luz relacionada (RLU) de la reacción es inversamente proporcional a la concentración de la T4 en la muestra del ensayo.

### MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 Micropozos recubiertos con anti-T4.
2. Enzima conjugada 2 viales de 6 ml.
3. Estándares de referencia 0, 1, 2.5, 5, 15 y 30 µg/dl (6 viales de 1 ml).
4. Sustrato A 6 ml.
5. Sustrato B 6 ml.
6. PBS-T buffer de lavado 2 bolsas de 5g.
7. Control 1 y 2 liofilizados.
8. 1 bolsa zip-lock.
9. 2 piezas de papel auto-adherible.
10. Instructivo de uso.

### MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión y puntas desechables.
2. Agua destilada.
3. Papel absorbente o una toalla de papel.
4. Mezclador Vórtex.
5. Papel milimétrico.
6. Luminómetro.
7. Incubadora.
8. Lavador de micropozos (opcional).

### ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. El equipo de prueba sin abrir debe almacenarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C. No congele. Evite luz intensa.
2. El equipo se puede utilizar hasta la fecha de caducidad del kit.
3. Los estándares reconstituidos deben ser usados dentro de 1 mes o congelarse a -20°C para un almacenamiento prolongado. Evitar múltiples ciclos de congelación-descongelación. Los micropozos después del primer uso, deben mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. Otros componentes abiertos se mantendrán estables durante al menos 2 meses, siempre que se almacenen en la forma descrita anteriormente.

### ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Las muestras de suero se deben tomar de acuerdo con los procedimientos de seguridad local.
3. Los estándares contienen componentes de origen humano, se han probado y no reaccionaron para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como anticuerpos contra el VIH. Todos los productos de origen animal y derivados han sido recogidos de animales sanos. Los componentes bovinos son originarios de países en los que la EEB no ha sido reportada. Sin embargo, los estándares y componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
4. Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel.
5. No fumar, comer, beber o usar cosméticos en la zona de trabajo. No pipetear con la boca. Usar ropa protectora y guantes desechables.
6. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
7. No mezclar o usar componentes con diferentes lotes.
8. Se recomienda que no se monten más de 32 pozos en cada ensayo si el pipeteado es manual, ya que todos los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pozos puede ser utilizada si la pipeta es automática.
9. Vuelva a colocar las tapas de los reactivos inmediatamente.
10. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados inválidos.

### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. El suero es el tipo de muestra recomendado para este ensayo. Las muestras de plasma con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con la prueba y deben ser evitadas.
2. Recoger todas las muestras siguiendo las precauciones universales para la venopunción.
3. Permita que la muestra se coagule antes de la centrifugación.
4. Evite muestras excesivamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
5. Las muestras pueden ser almacenadas hasta 48 horas de 2-8°C. Durante más tiempo de almacenamiento congelar a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Ajustar la incubadora a 37°C.
3. Para la preparación del Buffer de lavado, agregue 1 bolsa de buffer PBS-T en 500 ml de agua destilada. Mezcle gentilmente, asegúrese de que los sólidos se encuentren diluidos por completo. El buffer de lavado se mantendrá estable a temperatura ambiente por lo menos durante 2 meses.
4. Determine la cantidad de solución de sustrato necesaria y prepárela mezclando partes iguales del sustrato A y B.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

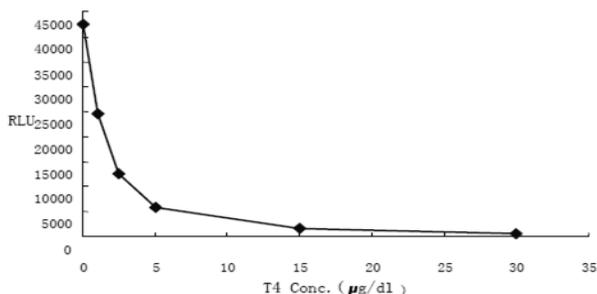
1. Asegure el número deseado de micropozos.
2. Dispense 50 µl de estándares, muestras y controles en sus respectivos pozos.
3. Agregue 100 µl de enzima conjugada en cada pocillo.
4. Mezclar bien durante 30 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.
5. Cubra la placa e incube a 37°C durante 60 minutos.
6. Retire la mezcla de la incubación y decante o aspire el contenido de la placa en un recipiente de residuos.
7. Enjuague los micropozos 5 veces con 350 µl de solución de lavado.
8. Golpee la placa con fuerza sobre papel absorbente para eliminar las gotas de solución de lavado residual.
9. Dispense 100 µl de la solución de sustrato A y B en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 10 segundos.
10. Coloque la placa en la cámara de detección del Luminómetro durante 5 minutos, a continuación, lea los RLU's de cada pocillo.

## CÁLCULO DE RESULTADOS

Le recomendamos utilizar el software adecuado para el cálculo de los resultados, en caso de que esto no sea posible, construya una curva estándar trazando los RLU's obtenidos a partir de cada calibrador en contra de su concentración en µg/dl en papel milimétrico, con los valores RLU en la vertical (eje Y) y las concentraciones en la horizontal (eje X). Utilice los valores RLU's de cada muestra graficándolos sobre la curva de calibración y observando la intersección con el eje de la concentración (eje X) cuantificar la cantidad de T4 µg/dl en cada una de ellas.

## EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Calibrador	Concentración
A	0
B	1
C	2.5
D	5
E	15
F	30



**Nota:** los valores aquí mostrados son solamente para ilustración y no deben usarse como curva estándar.

## VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe de establecer sus propios rangos normales basándose en la población de sus pacientes. Rango normal 5.0 a 13.0 µg/dl.

## PERFORMANCE

### 1. Precisión:

Este ensayo está diseñado para tener una precisión Intra-ensayo de <10%. Fueron probados 2 sueros humanos (bajo y alto) usando un lote de reactivos con 20 repeticiones. Los datos se muestran a continuación.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Bajo	20	3.94	0.23	5.84
Alto	20	11.23	0.42	3.74

Este ensayo está diseñado para tener una precisión Inter-ensayo de <15%. 2 sueros humanos fueron probados (bajo y alto) usando un lote de reactivos con 2 repeticiones, una vez por día durante 20 días. Los datos se muestran a continuación.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Bajo	40	3.87	0.33	8.53
Alto	40	10.85	1.05	9.68

### 2. Sensibilidad:

Se define como la concentración correspondiente a la media de RLU's de 20 repeticiones del calibrador A menos 2 desviaciones estándar y es de 4µg/dl.

### 3. Especificidad:

Este ensayo está diseñado para tener una especificidad de menos del 2.3% de reactividad cruzada con las sustancias enlistadas debajo, a la concentración aquí mostrada, en suero humano libre de hormonas.

Interferente	Concentración (ng/ml)	Valor medido (µg/dl)	Reactividad cruzada (%)
T3	500	1.08	2.16
rT3	500	0.78	1.56

## 4. Medición de precisión por correlación:

Un estudio fue diseñado en el cual las muestras fueron probadas usando este ensayo y un ensayo de T4 por ELISA que actualmente se comercializa. Los datos se muestran a continuación.

Método de correlación	Nº de muestras	Intercepto	Pendiente	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	127	0.9367	1.1321	0.957

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una comprensión completa del mismo y con el cumplimiento de correctas prácticas de laboratorio. La concentración sérica de T4 depende de una multiplicidad de factores: la función del hipotálamo y su regulación, concentración de TBG y la unión de la T4 a la TBG. Por lo tanto, la concentración total de T4 no es suficiente para evaluar el estado clínico del paciente y que éste no tenga problemas futuros.
- Los anticuerpos heterófilos en el suero humano y el factor reumatoide pueden interferir con los resultados. Los pacientes expuestos rutinariamente a los animales o productos de suero de origen animal pueden ser propensos a esta interferencia, por lo tanto, valores anómalos pueden ser observados. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico.
- Para el diagnóstico, los resultados obtenidos con esta prueba se deben utilizar siempre en conjunto con el examen clínico, la historia médica del paciente y otros hallazgos.

## REFERENCIAS

- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test. Ann. Clin. Biochem. 1997; 34(Pt 6): 579-581.
- Sterling K. Diagnosis and treatment of thyroid diseases. Cleveland: CRC Press; 1975.
- Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN, Nicoloff JT, Solomon DH. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory test in thyroid disorders. JAMA.1990; 263(11): 1529-1532.
- Glinoe D. The regulation of thyroid function in pregnancy: pathways of endocrine adaptation from physiology to pathology. Endocr. Rev. 1997; 18(3): 404-433.
- Demers LM, Spencer CA. Laboratory medicine practice guidelines: laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. Clin. Endocrinol. (Oxf).2003; 58(2): 138-140.