

INDICACION DE USO

El kit de prueba de FT4 CLIA, está destinado a la determinación cuantitativa para la concentración de suero humano de tiroxina libre.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La FT4 (tiroxina libre) es una indicadora de la actividad de la tiroxina en el cuerpo. También puede ser medida al igual que la tiroxina total, la cual depende de la tiroxina unida a TBG (globulina de unión a tiroxina). Bajo una condición normal de la tiroides, como la concentración de las proteínas portadoras se altera, los niveles de T4 total también cambian pero los de la T4 libre se mantienen constantes. Así, la medición de T4 libre se correlaciona mejor con el estado clínico que la T4 total. Los inmunoensayos de FT4 dependen de la disociación del T4 unido a proteínas para establecer la concentración de FT4 durante las perturbaciones del ensayo, las diferencias inter-ensayo en las perturbaciones, combinados con una variación en la concentración de T4 unido a proteínas en suero puede producir mediciones discordantes.

Por ejemplo, el incremento de T4 total asociado al embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos ocasionalmente resulta en niveles de T4 total bajo los límites normales mientras que la concentración de FT4 permanece en los rangos normales de referencia. Un enmascaramiento de la función anormal de la tiroides también puede ocurrir en condiciones tanto de hipertiroidismo como en hipotiroidismo por alteraciones en la concentración de TBG.

La T4 total puede estar elevada o disminuida por cambios de TBG de manera que los resultados de niveles normales de referencia son observados. Por lo que la concentración de FT4 típicamente descubre el estatus clínico actual del paciente. La función de la tiroides de la madre durante el primer trimestre del embarazo es una determinante importante del desarrollo temprano del cerebro fetal, debido a que la tiroides fetal no es capaz de producir T4 antes de las 12 a 14 semanas de gestación. Al mismo tiempo, bajas concentraciones de FT4 en el plasma materno durante el primer trimestre del embarazo puede ser también un importante factor de riesgo del desarrollo del infante desigual.

DESCRIPCION

Ensayo enzimático por quimioluminiscencia.

El kit de prueba FT4 CLIA se recubre cierta cantidad de anticuerpo anti f-t4 en pocillos de microtitulación. Se añaden a los pocillos de microtitulación una cantidad medida del suero del paciente y una cantidad constante de f-T4 conjugada con peroxidasa de rábano picante. Durante la incubación el conjugado de enzima f-T4 y la hormona f-T4 compite por los sitios de unión limitados en el anticuerpo anti f-T4. Después de una incubación de 60 minutos a 37°C, los pocillos se lavan con una solución de lavado para eliminar el conjugado de enzima f-T4 ensayados de la misma manera, se cuantifica la concentración de f-T4 en la muestra desconocida.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 pocillos impregnados con T4.
2. Enzima conjugada con anti-T4 (2 frascos 6 ml).
3. Estándares de FT4: 0, 5, 10, 25, 50 y 100 pmol/l (6 viales 1.0 ml).
4. PBS-T en Polvo (2 bolsas de 5 g).
5. Sustrato A, 6.0 ml (peróxido de hidrogeno).
6. Sustrato B, 6.0 ml (luminol).
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.
2. Agua destilada.
3. Papel absorbente o una toalla de papel.
4. Vórtex mezclador o equivalente.
5. Lavador de micropozos.
6. Luminómetro.
7. Incubadora.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. El equipo sin abrir debe guardarse a una temperatura de entre 2°C y 8°C y los pocillos deben guardarse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo se puede utilizar hasta la fecha de caducidad del mismo.

2. Los estándares reconstituidos deben ser usados dentro de los 30 días siguientes o conservarse a -20°C para periodos más largos. Una vez abiertos algunos componentes pueden ser estables por dos meses siempre y cuando se almacenen según lo estipulado anteriormente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso diagnóstico in vitro.
2. Las muestras de suero deben tomarse 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 hepatitis B, así como anticuerpos anti-VIH. Todos los productos de origen animal y derivados han sido recogidos de animales sanos. Los componentes de origen bovino son originarios de países en los que la EEB no ha sido reportada. Sin embargo, los estándares y los 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 aplicar cosméticos en la zona de trabajo. No pipetear con la boca. Se recomienda el uso de ropa protectora y guantes desechables.
6. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
7. No mezclar o usar componentes de 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 los procedimientos de prueba y deben ser evitadas.
2. Recolectar todas las muestras de sangre 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 entre 2°C-8°C. Para 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 ser sometidos a la temperatura ambiente (18°C-25°C) antes de su uso.
2. Ajustar la incubadora a 37°C.
3. Preparación del buffer de lavado: agregue 1 sobre de PBS-T en polvo a 500 ml de agua destilada. El buffer de lavado se mantendrá estable a temperatura ambiente por lo menos durante 2 meses.
4. Determine la cantidad de sustrato a utilizar y mezcle partes iguales del sustrato A y B en un contenedor limpio. Deseche el sustrato que no haya sido empleado después de 20 minutos.

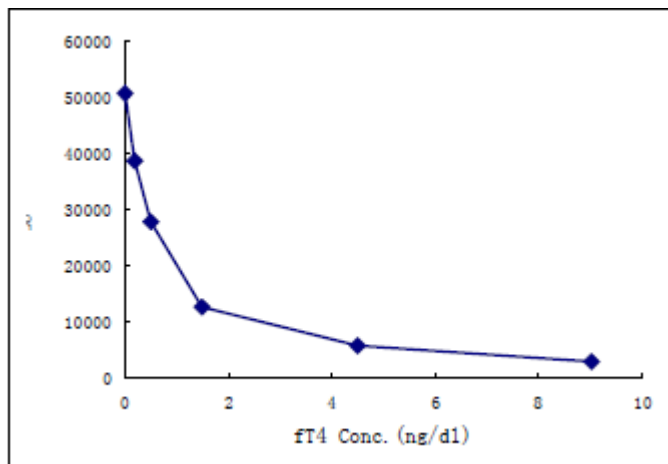
PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de micropozos.
2. Dispensar 50 µl de estándares, muestras y controles en cada micropozo.
3. Dispensar 100 µl de enzima conjugada a cada micropozo.
4. Mezclar suavemente durante 30 segundos. Es importante un mezclado completo en este paso.
5. Incubar a 37°C por 60 minutos.
6. Deseche el contenido de los micropozos por aspiración o decantación. Lavar la placa 5 veces con 350 µl de solución de lavado. Secar la placa sobre papel absorbente golpeando fuerte para eliminar todas las gotas de agua residual.
7. Dispensar 100 µl de sustrato preparado A y B. Mezcle suavemente durante 10 segundos.
8. Incubar dentro de la cámara de detección del Luminómetro durante 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU's.

CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule el valor medio de las muestras por duplicado. En su caso, los valores medios se deben utilizar para el trazado.
2. Grafique los RLU's para cada calibrador en el eje Y, contra la correspondiente concentración de FT4 en pmol/l en el eje X y trazara una curva de calibración a través de la conexión de los puntos trazados con líneas rectas.
3. Lea la concentración de cada control y la muestra por interpolación en la curva de calibración.
4. El uso de la computadora con la función "método de curva punto a punto con reducción de datos" simplifica estos cálculos.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR



Nota: los datos que aquí se muestran son solo como ilustración y no deben de tomarse en el lugar de una curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA

Un rango normal de 8.5 pmol/l a 22.5 pmol/l (95% de intervalo de confianza) se obtuvo probando 120 muestras de suero de individuos determinados como normales clínicamente. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal de acuerdo a la población de estudio con la que trabaje.

PERFORMANCE

1. Precisión:

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

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Bajo	20	0.92	0.05	5.84
Alta	20	3.37	0.18	5.46

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

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Baja	40	0.89	0.06	6.78
Alta	40	3.41	0.24	6.93

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 ≥ 2.5 pmol/l.

3. Especificidad:

Este ensayo está diseñado para tener una especificidad analítica de menos de 5 pmol/l, con las sustancias enlistadas y a las concentraciones ahí mencionadas.

Interferente	Concentración (ng/ml)	Valor medido (pmol/l)	Reactividad cruzada (%)
T3	500	0.19	<0.01
rT3	500	0.27	<0.01

4. Medición de precisión por correlación

Un estudio fue realizado, en el cual las muestras fueron probadas con este ensayo y un ensayo de FT4 en ELISA el cual está actualmente en el mercado. Los datos fueron analizados y se muestran a continuación.

Método de correlación	Nº de muestras	Intercepto	Pendiente	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	193	1.3725	0.973	0.938

CONTROL DE CALIDAD

Buenas prácticas de laboratorio requieren que las muestras de control de calidad deben procesarse con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo. Para asegurar el funcionamiento adecuado, un número estadísticamente significativo de los controles deben analizarse para establecer los valores medios y rangos aceptables. Los controles que contienen ácido de sodio no se debe utilizar.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Este ensayo no ha sido validado para el tamizaje del recién nacido. Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una completa comprensión de las instrucciones y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio. Anticuerpos heterófilos y el factor reumatoide en las muestras pueden interferir con los resultados. Los pacientes expuestos rutinariamente a los animales o productos del suero de origen animal pueden ser propensos a esta interferencia y se pueden observar resultados anómalos. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico. Los resultados obtenidos con este ensayo se deben utilizar siempre en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente y otros hallazgos. La disminución en los valores de tiroxina libre se encuentra asociado con enfermedades de pérdida de proteínas, ciertas enfermedades del hígado y la administración de testosterona, difenilhidantoína o salicilatos. Una lista de fármacos y condiciones que interfieren, las cuales afectan los valores de FT4, ha sido elaborada por la Revista de la Asociación Americana de Químicos Clínicos.

REFERENCIAS

1. Dayan CM. Interpretation of thyroid function test. Lancet. 2001; 357(9256): 619-624.
2. Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Underestimates of serum free thyroxine (T4) concentrations by free T4 immunoassays. J. clin. Endocrinol. Metab. 1994; 79(1): 76-79.
3. Pop VJ, Kuijpers JL, van Baar AL, et al. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. Clin. Endocrinol. (Oxf). 1999; 50(2): 149-155.
4. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Ann. Clin. Biochem. 1997; 34.