

**Reactivos para la Determinación de Hormona Tiroxina Libre
(Free T4)**

Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en Laboratorios Clínicos o de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo enzimático de fT4

USO DESTINADO

Determinación cuantitativa de la concentración de Tiroxina libre (fT4) en suero humano por inmunoensayo enzimático en microplaca. Se cree que los niveles de fT4 reflejan la cantidad de T4 disponible para las células y por lo tanto pueden determinar el estado metabólico clínico de T4.

INTRODUCCIÓN

Tiroxina, la hormona tiroidea principal, circula en la sangre casi completamente atada acarreado proteínas. El sostén principal es la globulina tiroxina-atada (TBG). De cualquier manera, solo la porción libre (desatada) de tiroxina es responsable de la acción biológica. Mas adelante, las concentraciones de las proteínas de sostén están alteradas en condiciones clínicas variables, tales como el embarazo. En funciones tiroideas normales como las concentraciones de las proteínas alteradas, acarreadas, el nivel de tiroxina total cambian para que las concentraciones de tiroxina libre se mantengan constantes. Así, las mediciones de concentraciones de tiroxina libre correlaciones mejor con el status clínico que los niveles de tiroxina total.

El incremento de tiroxina total asociada con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos ocasionalmente resulta en niveles de T4 total sobre los límites de lo normal del rango de referencia. Enmascarando la función tiroidea anormal puede ocurrir también tanto en condiciones de hiper o hipotiroidismo por alteraciones en la concentración de TBG. El t4 Total puede elevarse o disminuir por los cambios de TBG tales como el resultado de los niveles normales de referencia. La concentración de tiroxina libre puede ayudar a descubrir el status clínico actual del paciente.

En este método, la referencia del suero, el espécimen paciente, o el control primero se agrega a una placa de micropozos. Se agrega a la enzima conjugada de T4 (método análogo), y se mezclan los reactivos. Resultado de una reacción de la competición entre la enzima conjugada y la tiroxina libre para un número limitado del anticuerpo que combina los sitios inmovilizados en el pozo.

Después de la terminación del período requerido de incubación, el anticuerpo límite de la enzima-Tiroxina conjugada es separada de la conjugación desatada de enzima -Tiroxina por un paso de lavado. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir color.

El empleo de varias referencias del suero de la concentración conocida de tiroxina libre permite la construcción de un gráfico de actividad y concentración. De la comparación a la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de Tiroxina Libre

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los reactivos esenciales requeridos para una fase sólida de enzima en inmuno ensayo incluye el anticuerpo inmovilizado, enzima-antígeno conjugado y antígeno nativo. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, el conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y la conjugación del enzima-antígeno para un número limitado de sitios insolubles unidos.

Después de logrado el equilibrio, la fracción anticuerpo-límite es separada del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática, en la fracción del anticuerpo-atado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Utilizando varias diversas referencias del suero de los valores del antígeno conocido, una curva a la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

Materiales provistos en el equipo

1. Placa con micropozos cubiertos de anticuerpo T4
2. Juego de estándares de referencia que contienen 0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 ng/dl.
3. Concentrado de enzima conjugada Free T4 HRPO (20x)
4. Diluyente de enzima conjugada Free T4 HRPO
5. Reactivo TMB
6. Solución búfer de lavado concentrado (50x)
7. Solución de paro

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 50 µL-200 µL y 1.0 mL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadriculado
7. Un lector de MicroElisa.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

El suero debe ser preparado de un espécimen de sangre entera obtenida por medio de técnicas médicas aceptables. Este equipo de prueba es para uso solamente con muestras de suero sin aditivos

PRECAUCIONES

Todos los productos que contienen suero humano se han encontrado no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, anticuerpos HIV1 y 2 además de HCV por reactivos aprobados por la FDA.

Ya que ninguna prueba conocida puede ofrecer una garantía completa de ausencia de agentes infecciosos, los productos de suero humano deben ser manejados como peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. En los Centros para el Control de Enfermedades / Instituto Nacional de Salud, "Biosecurity in Microbiological and Biomedical Laboratories", 2ª Edición, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395, se pueden encontrar buenos procedimientos de laboratorio para el manejo de productos sanguíneos.

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Prepare el búfer de lavado (1x) diluyendo una parte de la solución de lavado concentrado (50x) en 49 partes de agua destilada.
2. Para preparar reactivo de conjugado de trabajo añada 0.10 mL de concentrado de enzima conjugada Free T4 HRPO a 2.0 mL de diluyente de conjugado Free T4 HRPO (1:20) y mezcle bien. La cantidad de conjugado diluido dependerá de la cantidad de muestras a ensayar. El reactivo de conjugado es estable a 4°C por máximo dos semanas.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con la prueba, traiga todos los reactivos, referencias de suero y los controles a temperatura ambiente (18 a 22 °C).

1. Corte y enumere los pocillos para cada suero de referencia, control y muestra del paciente que se va a probar por duplicado.
2. Dispense 50 µL del suero de referencia, control y muestra dentro del pozo apropiado.
3. Añada 100 µL del reactivo FT4- enzima conjugado a todos los pozos.
4. Agite la Micro placa cuidadosamente por 20-30 segundos para mezclar.
5. Incube por 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Deseche la mezcla incubada vaciando el contenido en un recipiente para desechos.
7. Lave y enjuague la microplaca 5 veces con la solución búfer de lavado (1x).
8. Golpee los pozos firmemente hacia el papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales.
9. Añada 100 µL de reactivo TMB en cada uno de los pozos. Mezcle perfectamente por 5 segundos e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Añada 100 µL de solución de paro. Mezcle suavemente por 5-10 segundos. Es importante asegurarse que el color azul generado vire a color Amarillo completamente.
11. Lea la absorbancia a 450 nm en un lector de Micro placa en un plazo no mayor a 15 minutos.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

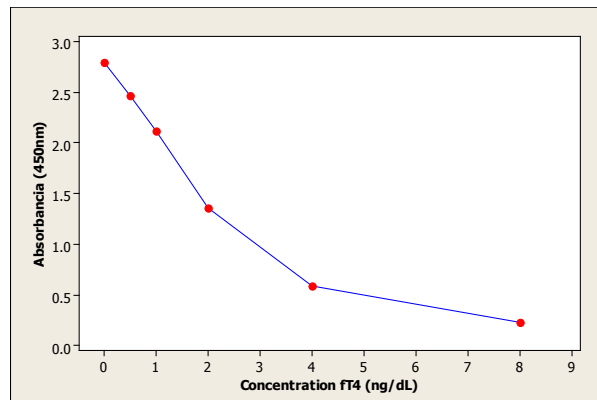
1. Calcule el valor de la media de la absorbancia (A_{450}) por cada set de estándares de referencia, controles y muestra de pacientes.
2. Construya una curva estándar trazando la media de la absorbancia de cada estándar de referencia contra la concentración en ng/dL en papel gráfico, con los valores de la absorbancia sobre el eje vertical o eje "Y", y las concentraciones sobre el eje horizontal o eje "X".
3. Use los valores de la media de absorbancia de cada espécimen a determinar la concentración correspondiente de FT4 en ng/dL de la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje "Y" contra las concentraciones de FT4 mostradas en el eje "X". Esta curva estándar es para el propósito de ilustración solamente, y no debe ser usada con cálculos desconocidos cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

| ft4 (ng/dL) | Absorbancia (450 nm) |
|-------------|----------------------|
| 0.0 | 2.795 |
| 0.5 | 2.470 |
| 1.0 | 2.113 |

| | |
|-----|-------|
| 2.0 | 1.353 |
| 4.0 | 0.585 |
| 8.0 | 0.227 |



CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

PRECISIÓN

La precisión inter e intra ensayo de la prueba Free-T4 fue determinada por análisis en tres diversos niveles de sueros de pacientes agrupados. El número, valores medios, desviación estándar (SD) y coeficiente de variación para cada uno de estos sueros se presentan a continuación:

Precisión Intra-ensayo

| | S1 | S2 | S3 |
|------------|-------|-------|-------|
| Número (N) | 20 | 20 | 20 |
| Media | 0.65 | 1.83 | 2.98 |
| SD | 0.07 | 0.086 | 0.111 |
| CV | 10.8% | 4.7% | 3.7% |

Precisión Inter-ensayo

| | S1 | S2 | S3 |
|------------|-------|-------|-------|
| Número (N) | 10 | 10 | 10 |
| Media | 0.64 | 1.89 | 3.07 |
| SD | 0.071 | 0.116 | 0.167 |
| CV | 11.1% | 6.1% | 5.4% |

SENSIBILIDAD

El procedimiento FREE-T4 tiene una sensibilidad de 0.25 ng/dl. La sensibilidad se determinó mediante la variabilidad del calibrador cero 0 ng/dl y utilizando una SD (95% confianza) para calcular la dosis mínima.

ESPECIFICIDAD

La reactividad cruzada del anticuerpo de tiroxina, que se utiliza para los ensayos de FREE-T4 fue evaluada mediante la adición de grandes cantidades de la sustancia que interfería a una matriz del suero. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre las dosis de sustancia que interfería a dosis de tiroxina necesaria para desplazar la misma cantidad de conjugado.

| SUSTANCIA | REACTIVIDAD CRUZADA | CONCENTRACIÓN |
|------------|---------------------|---------------|
| L-Tiroxina | 1.00 | - |
| D-Tiroxina | 0.99 | 10 µg/dL |

| | | |
|-------------------|--------|-----------|
| D-Triyodotironina | 0.014 | 100 µg/dL |
| L-Triyodotironina | 0.028 | 100 µg/dL |
| Yodotironina | 0.0001 | 100 µg/mL |
| Diyodotirosina | 0.0001 | 100 µg/mL |
| Diyodotironina | N/D | 100 µg/mL |
| TBG | N/D | 40 mg/mL |
| Albumina | N/D | 40 mg/mL |
| Fenilbutazona | N/D | 10 mg/mL |
| Fenitoina | N/D | 40 mg/mL |
| Salicilatos | N/D | 500 mg/mL |

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Al igual que con todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, sólo debe ser realizada por el médico después de que los hallazgos clínicos y de laboratorio han sido evaluados.
2. Los estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados de inmunoensayo en algunos pacientes que presentan factor reumatoide y anticuerpos antinucleares. Las muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón para fines de diagnóstico o terapéuticos, pueden contener anticuerpos frente a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no se puede garantizar la eliminación de todos los efectos de esta.
3. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente causará una deficiente precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.

REFERENCIAS

1. Barker, S.B. "Determination of Protein Bound Iodine", *Journal Biological Chemistry* 173, 175 (1948).
2. Chopra, IJ, Solomon, DH, and Ho, R.S. "A Radioimmunoassay of Thyroxine", *J. Clinical Endocrinol*, 33, 865 (197)
3. Young, D.S. Pestaner, L.C. And Gilberman, U. "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Test". *Clinical Chemistry*, 21, 3660 (1975)
4. Sterling L, *Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease*, Cleveland, CRC Press P. 19-51 (1975)
5. Halpem EP and Bordens RW. "Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay. Determination of free Thyroxine". *Clinical Chemistry*, Vol 25, 1561-1563 (1979).
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).

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA