

Reactivo para la Determinación de la Hormona Tiroxina (T4)**Solo para diagnóstico In Vitro****Para uso exclusivo en Laboratorios Clínicos o de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C****USO DESTINADO**

Para la determinación cuantitativa de tiroxina total (T4) en suero humano.

INTRODUCCIÓN

L-Tiroxina (T4) es una hormona que es sintetizada y almacenada en la glándula tiroidea. El desdoblamiento proteolítico de la tiroglobulina folicular libera T4 al torrente sanguíneo. Más del 99% de T4 es reversiblemente unida a tres proteínas del plasma en sangre - tiroxina uniéndose a la globulina (TBG) 70%, la tiroxina unida a la pre-albúmina (TBPA) 20%, y la albúmina 10%. Aproximadamente 0.03% de T4 está liberada, el estado de desunión en la sangre puede darse en cualquier momento. Las enfermedades que afectan la función tiroidea pueden presentar una amplia serie de síntomas confusos. La medición total de T4 por inmunoensayo es la prueba de tamizado más fiable y conveniente disponible para determinar la presencia de desórdenes tiroideos en pacientes. Niveles elevados de T4 pueden encontrarse en hiper-tiroidismo debido a la enfermedad de Grave, a la enfermedad de Plummer y en tiroiditis aguda y sub-aguda. Niveles bajos de T4 han sido asociados con hipotiroidismo congénito, mixedema, tiroiditis crónica (enfermedad de Hashimoto) y con algunas anomalías genéticas.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

En el T4 EIA, una cierta cantidad de anticuerpo del anti-T4 cubre las cavidades de los micropozos. Una cantidad moderada del suero del paciente, y una cantidad constante de T4 conjugada con la peroxidasa de rábano picante se agrega a las cavidades de los micropozos. Durante la incubación, T4 y el conjugado T4 compiten por los sitios de unión limitados en el anticuerpo de anti-T4. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, los pozos se lavan 5 veces con agua para quitar lo que no se une al conjugado T4. Una solución de TMB se agrega entonces y es incubada durante 20 minutos, mientras se produce el desarrollo de color azul. El color revelado es detenido con la adición de solución de paro, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad presente de la enzima y se relaciona inversamente a la cantidad sin etiquetar de T4 en la muestra. Para la referencia a una serie de normas de T4 en ensayos de la misma manera, la concentración de T4 en la muestra desconocida es cuantificada.

REACTIVOS**Materiales abastecidos con el equipo de prueba:**

1. Placa de micropozos cubiertos de IgG Anti-oveja de T4 con 96 pozos
2. Concentrado de Enzima Conjugada. 1 Vial
3. Diluyente de Enzima Conjugada. 1 Frasco
4. Estándares de Referencia de T4. 1 Juego. En forma líquida (listos para utilizarse) o en forma liofilizada.
5. Reactivo de TMB. 1 Frasco

6. Solución de Paro (1N HCl). 1 Frasco
7. Solución búfer de lavado concentrado (50x)

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 40 - 200 µL, 1.0 - 5.0 mL
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada
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.

ALMACENAMIENTO DEL KIT DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

1. Los equipos de prueba sin abrir deben almacenarse a 2-8 °C desde su recepción y la placa de micro pozos debe guardarse en una bolsa sellada con el secante para minimizar la exposición al aire húmedo. El kit de prueba puede ser utilizado durante toda la fecha de vencimiento del kit. Consulte la etiqueta para la fecha de caducidad.
2. Los equipos de pruebas abiertos permanecerán estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre y cuando sean guardados como anteriormente se describe.
3. El lector de placa de micro pozos con un ancho de banda de 10 nm o menos y con un rango de densidad óptica de 0-2 DO o mayor en 450nm de longitud de onda es aceptable para su uso en la medición de la absorbancia.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-22 °C) antes de su uso.
2. Para preparar el conjugado de trabajo añada 0.1 mL del Concentrado de Conjugado T4-HRPO (11x) a 2.0 mL del Diluyente de Conjugado T4 (dilución 1:20) y mezcle bien. La cantidad de conjugado diluido depende del tamaño del ensayo. El conjugado de trabajo es estable a 4°C al menos por dos semanas.
3. En caso de que los estándares se encuentren liofilizados, reconstituir con 0.5 mL de agua destilada. Después de reconstituidos deje en reposo por 20 minutos. Los estándares reconstituidos deben almacenarse entre 2-8°C.
4. Diluir un volumen de búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de búfer de lavado concentrado (50x) en agua destilada para preparar un volumen final de 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

Nota: El ensayo de T4 es un análisis sensible de la temperatura. Las mejores condiciones de temperatura para este ensayo es de 19 a 22° C. Si, en las condiciones de ensayo del medio ambiente, la temperatura es mayor de lo esperado, se recomienda aumentar la dilución de conjugado T4 hasta 1:40

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

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en un soporte.
2. Deposite 25µL de estándares, especímenes y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 100 µL del **Reactivo Conjugado de trabajo** en cada pozo.
4. Mezcle durante 10 segundos. Es muy importante mezclar completamente.
5. Incubar a temperatura ambiente (18-22 °C) durante 45 minutos.
6. Remover la mezcla de la incubación golpeando el contenido del plato a un recipiente de desechos.
7. Lavar el exceso de enzima con la solución búfer de lavado (1x) 5 veces.
8. Golpeé los pozos firmemente hacia el papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales.
9. Deposite 100 µL de Solución TMB en cada pozo. Suavemente mezcle durante 5 segundos.
10. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad durante 15 minutos.
11. Detenga la reacción agregando 100 µL de solución de paro a cada pozo.
12. Mezcle suavemente durante 5 segundos.
13. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de micro pozos durante los primeros 15 minutos.

Nota importante: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede afectar la precisión y elevar falsamente la absorbancia.

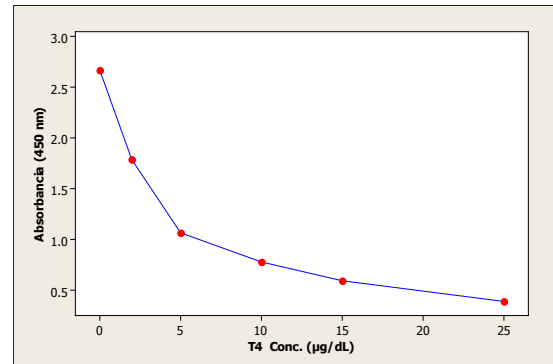
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en µg/dL sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de T4 en µg/dL desde la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm son mostrados en el eje Y contra las concentraciones de T4 mostradas en el eje X. *Nota: Esta curva estándar tiene el propósito de ilustrar solamente y no deberá ser usada para cálculos desconocidos. Cada laboratorio deberá proveer sus propios datos y curvas estándar en cada experimento.*

T4 (µg/dL)	Absorbancia (450 nm)
0.0	2.795
1.0	1.848
2.5	1.270
5.0	0.838
15.0	0.389
30.0	0.172



VALORES ESPERADOS

El ensayo de ELISA T4 se utilizó en un estudio de 200 muestras de pacientes con eutiroidismo (según lo determinado por el análisis de laboratorio de un hospital) en una ubicación geográfica. Los resultados de las muestras analizadas se encuentran en un rango entre 5.0 y 13.0 µg/dL. El rango fue determinado por los valores observados y que además corresponden a los sugeridos por el fabricante. Se recomienda que los laboratorios ajusten los valores para reflejar las diferencias geográficas y de población. La concentración mínima detectable de este ensayo de tiroxina es de 0.5 µg/dL.

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. Skelley, D., Brown, L, and Besch, P, "Radioimmunoassay", *Clin. Chem*, 19(2):146 (1973)
2. Wistom, G.B. *Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem.* 22: 1243; 1976.
3. Schuurs, A.H.W.M. and Van Weman, B.K. *Review, Enzyme-immunoassay. Clin. Chem. Acta.* 81:1; 1977
4. Ravel, R, *Clinical Laboratory Medicine, Year Book Medical Publ., Chicago* (1973)
5. Robbins, J, "Radioassay and Thyroid Gland", *Metabolism*, 22(8):1021 (1973)

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

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