

ft4

Prueba ELISA para la determinación cuantitativa de Tiroxina Libre (ft4) en suero humano

Presentación del estuche

REF	54025	96 determinaciones	Estuche completo
IVD			

Uso previsto

La L-tiroxina (T4) es la hormona más importante del tiroides. Como la T3, es secretada en la circulación en respuesta a la tirotrópina (TSH). Las dos, T3 y T4, juegan un papel importante en el metabolismo regulador.

La T4 está presente en la circulación casi totalmente (> 99,9%) unida a proteínas plasmáticas, sobre todo a la globulina unida a tiroxina (TBG)¹. El resto no unido de T4 circula libremente (ft4). Parece ser la forma biológica activa de la hormona.

En muchos factores clínicos (p.ej. embarazo) con una función normal del tiroides, la concentración de las proteínas de fijación y por consecuencia el nivel de T4 total pueden ser influidos mientras que el nivel de ft4 no cambia. Así mismo, la toma de anticonceptivos orales, un tratamiento de estrógenos, la toma de drogas² e inhibidores de los proteínas de fijación³ pueden resultar en valores alterados anormales de T4 total con valores de ft4 en el rango normal. La concentración de T4 es mucho más en correlación al estado clínico que el nivel de T4 total.

La determinación de ft4 se indica tanto en el hipertiroidismo como en el hipotiroidismo. Es un reflejo del estado clínico actual del paciente ya que las alteraciones en la concentración de las proteínas de fijación pueden resultar en valores normales de T4 total que disimulan la función anormal del tiroides.

Principio - EIA Competitivo -

La prueba de ft4 ELISA está basada en el principio de la unión competitiva entre la ft4 de la muestra y el conjugado de T4-peroxidasa por un número limitado de sitios de unión del anti-T4 (monoespecíficos, oveja) unido al pocillo. Así la cantidad de conjugado de T4-peroxidasa que se une al pocillo es inversamente proporcional a la concentración de ft4 en la muestra.

Luego de la incubación con la muestra el conjugado de T4-peroxidasa sin unir y en estado de equilibrio es removido por el lavado. La solución de sustrato se agrega (etapa 2) y se desarrolla un color azul. La intensidad de este color, el cual cambia a amarillo luego de agregar la solución de parada, es inversamente proporcional a la cantidad de ft4 en la muestra.

La absorbancia de los calibradores y las muestras es determinada usando un lector de micropocillos de ELISA (HUMAREADER) a 450 nm. La concentración de las muestras es interpolada de acuerdo a la curva generada al utilizar los calibradores de suero de concentraciones antigénicas conocidas.

Reactivos y contenidos

MIC	12	Tiras de Micropocillos (en portatiras) Tiras divisibles de 8 pocillos, recubiertos con anti-T4 (oveja)	
CAL	A - F 6x2,0ml	Calibradores, específicos al lote (tapa blanca) listos para usar, en suero humano <i>¡Ver etiquetas para concentraciones exactas!</i>	
CON	13 ml	Conjugado enzimático-antígeno (tapa blanca) Listo para usar, <u>coloreado verde</u> Conjugado T4-HRP en una matriz proteica estabilizada	pH 7,45 ± 0,1 1 %
WS	20 ml	Solución de Lavado (tapa negra) Concentrado para 1000 ml Buffer MOPS salino	pH 8,8 ± 0,4 5 mmol/l
SA	7,0 ml	Reactivo Substrato A (tapa amarilla) 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) Buffer Acetato de Sodio	pH 3,5 ± 0,1 4 mmol/l 0,05 mol/l
SB	7,0 ml	Reactivo Substrato B (tapa azul) Peróxido de Urea Hidrógeno Buffer Acetato de Sodio	pH 4,5 ± 0,1 10 mmol/l 0,05 mol/l
STOP	7,5 ml	Solución de Parada (tapa roja) Acido sulfúrico	0,5 mol/l
	1	Tira adhesiva	

Agentes preservantes: Concentración total < 0,04 %

Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **CAL** deberían ser manipulados como posibles agentes potencialmente infecciosos. **CAL** han sido encontrados negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **CAL** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

STOP irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abiertos, los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver "Nota").

MIC

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas hasta la fecha de expiración (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso deberían siempre estar almacenados a 2...8°C.

Solución de trabajo de Lavado **WASH**

- **Una ligera turbidez que puede aparecer en el concentrado **WS** se disuelve completamente durante la dilución.**
- Diluir **WS** a 1000 ml con agua desionizada fresca en un envase apropiado. Enjuagar el envase varias veces.
- Estabilidad: **60 días a 15...25°C.**

Solución de trabajo Substrato **SUB**

- **Para un uso prologado:** preparar cantidad necesaria mezclando porciones iguales **SA** y **SB**. Usar solamente un envase plástico limpio previamente enjuagado con agua desionizada.
- **Utilizar dentro de 30 días:** Verter el contenido de un frasco de **SA** en un frasco de **SB** y mezclar. Almacenar de 2...8°C.
- ¡Manipular **SUB** cuidadosamente y evitar la contaminación! ¡No utilizar si es de color azul!
- Almacenar la solución protegida de la luz intensa.
- Estabilidad: **30 día a 2...8°C.**

Muestra

Suero

No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.

Las muestras pueden almacenarse por 48 horas a 2...8°C, o por hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez.** Al descongelar una muestra debe ser homogeneizada. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

Procedimiento

Seguir el procedimiento exactamente como se describe.

Notas de uso

U1: No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.

U2: No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.

U3: Notar el reparto **CAL**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.

U4: **MIC** – sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.

U5: **Analizar** cada **CAL**, control o muestra **por duplicado. Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.

U6: **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos.** Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **CAL** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración para cada placa.

U7: Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

U8: [SUB] inicia y [STOP] termina una reacción cinética. Evitar la luz intensa durante el desarrollo del color.

U9: [MIC] - Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec. sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si está disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Remover las tiras adhesivas, aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, remover el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Etapa 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2 Calibradores	E2... Muestras
[CAL] A-F; en duplicado	50	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	50
[CON]	100	100
Mezclar y cubrir [MIC] con cinta adhesiva		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 3 veces como se describe (ver L1 – L3)		
[WASH]	300	300
Etapa 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	50	50
Mezclar cuidadosamente		
Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 min. después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si está disponible).		

Validación de la prueba

Los resultados son válidos si se cumplen los siguientes criterios :

[CAL]	Rango aceptado [OD]
A	$\geq 1,5$
B	$\leq 0,96 \times$ absorbancia [CAL] A
C	$\leq 0,95 \times$ absorbancia [CAL] B
D	$\leq 0,85 \times$ absorbancia [CAL] C
E	$\leq 0,85 \times$ absorbancia [CAL] D
F	$\leq 0,65 \times$ absorbancia [CAL] E

Las diferencias entre los duplicados de [CAL] no deben exceder el 10%.

Cálculo

Una curva de calibración se usa para interpolar la concentración de FT4 en las muestras desconocidas.

- [CAL] - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de FT4 en ng/dl sobre papel milimetrado lineal (no promediar los duplicados de los calibradores antes de graficar).
- Trazar la mejor curva a través de los puntos graficados.
- Para determinar la concentración de FT4 en una muestra desconocida (S), localizar el promedio de absorbancia de los duplicados sobre el eje vertical del gráfico, hallar el punto de intersección sobre la curva, y leer la concentración (en ng/dl) en el eje horizontal del gráfico (ver ilustración).

Interpretación de resultados - limitaciones

FT4 es independiente de la concentración y capacidad de fijación de las proteínas de fijación. Por lo tanto, la determinación adicional de parámetros de fijación (T-uptake, TBG) no es necesaria.

- No se recomienda diluir muestras con altas concentraciones (absorbancia por encima de [CAL] F). Las variaciones de TBG en diferentes matrices hacen imposible una dilución serial de FT4.
- La heparina puede modificar la concentración de FT4 in vivo e in vitro. Por lo tanto, coleccionar las muestras antes de que el paciente se someta a una terapia anticoagulante⁴.

- Autoanticuerpos circulantes contra FT4, inhibidores de las proteínas de fijación y una alta concentración de factores reumáticos pueden interferir^{5,6}.

- Variaciones fuertes de la capacidad de fijación de la albumina por T4 (muy raro: hipertiroxinemia familiar disalbumínica, FDH) pueden resultar en interpretaciones falsas⁷.

¡La prueba no ha sido evaluada para el screening de los recién nacidos!

Para el diagnóstico definitivo deben, además de los resultados del análisis, tenerse en cuenta la anamnesis y exámenes clínicos adicionales, ya que la concentración de FT4 puede ser influida por una variedad de factores, incluido la toma de drogas que pueden modificar la capacidad de fijación de las proteínas plasmáticas^{8,9}.

Valores esperados

	Adultos	Mujeres embarazadas
Media (X)	1,4 ng/dl	1,5 ng/dl
Desviación Estándar (D.S.)	0,3 ng/dl	0,37 ng/dl
Rango Esperado (± 2 D.S.)	0,8 – 2,0 ng/dl	0,8 – 2,2 ng/dl

Cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia teniendo en cuenta el equipo utilizado, la toma de la muestra de sangre, métodos y técnicas comúnmente utilizadas en el laboratorio ya que los niveles de FT4 son influenciados por factores geográficos y dieta.

Características de la ejecución

La prueba FT4 ELISA tiene una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,5 ng/dl de FT4.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

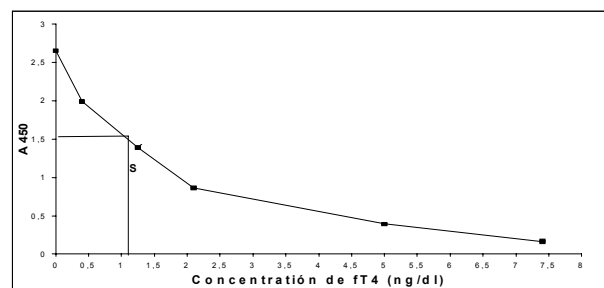
www.human.de/data/gb/vr/el-ft4.pdf o www.human-de.com/data/gb/vr/el-ft4.pdf

Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



Referencias

- Wosilait, W.D., Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. **16**, 541 (1977)
- Wenzel, K.W., Metabolism **30**, 717 (1981)
- Konishi, J. et al., Clin. Chem. **28**, 1389 (1982)
- Lundberg, P.R. et al., Clin. Chem. **28**, 1241 (1982)
- Bhagat, C. et al., Clin. Chem. **29**, 1324 (1983)
- Norden, A.G.W. et al., Clin. Chem. **43**, 957 (1997)
- Lalloz, M.R. et al., Clin. Endocrinology **18**, 11 (1983)
- Young, D.S. et al., Clin. Chem. **21**, 3660 (1975)
- Sterling, L, Diagnosis and treatment of thyroid disease, Cleveland, CRC Press, 19-51 (1975)

EL-FT4
INF 5402501 E
06-2004-5



Human