

T4

Prueba ELISA para la determinación cuantitativa de Tiroxina Total (T4) en suero o plasma humanos

Presentación del estuche

[REF]	54020	96 determinaciones	Estuche completo
[IVD]			

Uso previsto

La L-Tiroxina (T4) es una hormona sintetizada y almacenada en el tiroides. Más del 99% de T4 en la sangre está unida reversiblemente a las proteínas plasmáticas (principalmente a Globulina unida a Tiroxina, TBG).

La medición de T4 total por prueba de inmunoensayo es una de las más confiables y convenientes pruebas disponibles para determinar la presencia de problemas tiroideos. Niveles elevados de T4 han sido encontrados en hipertiroidismo debido a enfermedad de Grave y de Plummer así como en tiroiditis aguda y subaguda. Bajos niveles de T4 han sido asociados con cretinismo, mixedema, enfermedad de Hashimoto y algunas anomalías genéticas.

Principio - EIA Competitivo -

La prueba de T4 ELISA está basada en el principio de la unión competitiva entre el T4 de la muestra y el conjugado de T4-peroxidasa por un número limitado de uniones en el pocillo con anti-T4 (oveja). Así la cantidad de conjugado T4-peroxidasa que se une al pocillo es inversamente proporcional a la concentración de T4 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 lavado. La solución de sustrato se agrega 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 T4 en la muestra.

La absorbancia de los controles y las muestras es determinada usando un lector de micropocillos de ELISA (HUMAREADER) a 450 nm. La concentración de las muestras es interpolada en 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	Calibradores (tapa blanca) 6x2,0ml listos para usar, en suero humano Concentraciones de T4: 0 (A), 2,0 (B), 5,0 (C), 10,0 (D), 15,0 (E) y 25,0 (F) µg/dl	
[CON]	1,5 ml	Enzima Conjugado -antigénico (tapa blanca) Conjugado T4-HRP, coloreado amarillo en una matriz proteica estabilizada	pH 7,45 ± 0,1 1 %
[C-DIL]	13 ml	Buffer para el Conjugado (tapa blanca) Buffer de fosfato, coloreado rojo	pH 7,5 ± 0,1
[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 Conjugado **[WCON]**

Diluya **[CON]** 1 + 10 con **[C-DIL]**:

p.ej. diluya 160 µl **[CON]** con 1,6 ml **[C-DIL]** para 16 pocillos.

Estabilidad: **24 h de 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 sustrato **[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 o plasma (EDTA, Heparina)

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	25	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	25
WCON	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 :

Absorbancia máxima (**CAL A**) D.O. $\geq 1,5$

Concentración T4 al 80% absorbancia máx. = $2,2 \pm 0,8 \mu\text{g/dl}$

Concentración T4 al 50% absorbancia máx. = $7,3 \pm 2,0 \mu\text{g/dl}$

Concentración T4 al 25% absorbancia máx. = $19,0 \pm 7,0 \mu\text{g/dl}$

Cálculo

Una curva de calibración se usa para interpolar la concentración de T4 en las muestras desconocidas.

- CAL** - Graficar la absorbancia de los duplicados contra la correspondiente concentración de T4 en µg/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 T4 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 µg/dl) en el eje horizontal del gráfico (ver ilustración).

Interpretación de resultados

La concentración total de tiroxina en suero es dependiente de varios factores: la función de la glándula tiroides y su regulación, de la concentración de globulina unida a tiroxina (TBG), y la unión de tiroxina a TBG^{3,4}. De tal manera, la concentración de tiroxina total por sí sola no es suficiente para indicar el estado clínico del paciente.

Los valores de tiroxina total en suero pueden elevarse bajo ciertas condiciones, como embarazo o ingesta de anticonceptivos orales. Una disminución en los valores de T4 se encuentran en enfermedades carentes de proteína, ciertas enfermedades del hígado y en la administración de hormonas y drogas³. Un mejor diagnóstico de tirostasis en algunas situaciones puede ser obtenido con la prueba de TRH.

Valores esperados

	Hombres	Mujeres
Media (X)	7,6 µg/dl	8,2 µg/dl
Desviación Estándar (D.E)	1,6 µg/dl	1,7 µg/dl
Rango Esperado (± 2 D.E)	4,4 - 10,8 µg/dl	4,8 - 11,6 µg/dl

Pacientes normales con niveles altos de TBG no fueron excluidos excepto en el embarazo.

Cada laboratorio debe establecer sus propios Valores de referencia teniendo en cuenta el equipo utilizado, la toma de muestra de la sangre, métodos y técnicas comúnmente utilizadas en el laboratorio ya que los niveles de T4 son influenciados por factores geográficos y por dieta.

Datos de rendimiento

La prueba T4 ELISA tiene una sensibilidad analítica de aproximadamente 0,4 µg/dl T4.

Las muestras con T4-concentraciones sobre 25 µg/dl pueden diluirse con **CAL A** y ser reanalizadas. Para obtener la concentración de estas muestras se multiplica el resultado por el factor de dilución.

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-t4.pdf o

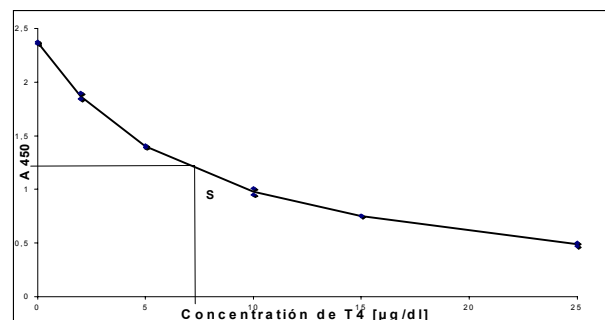
www.human-de.com/data/gb/vr/el-t4.pdf

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

- Barker, S.B., Determination of Protein Bound Iodine, Journal Biological Chemistry **173**, 175 (1948)
- Chopra, I.J. *et al.*, A Radioimmunoassay of Thyroxine, J. Clinical Endocrinol. **33**, 865 (1971)
- Young, D.S. *et al.*, Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests, Clinical Chemistry **21**, 3660 (1975)
- Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC Press p. 19 - 51 (1975)

EL-T4
INF 5402001 E
06-2004-15



Human