

en

# Immunoassay










**REF** E1005

96 tests/192 tests

## FT4 ELISA

Microplaca basada ELISA (ensayo de enzima unida inmunoabsorbente) para la determinación cuantitativa de FT4 (tiroxina libre) en el suero humano.

All trademarks are properties of their respective owners.

Key to Graphical Symbols Used			
	Código Lote		Vencimiento
	Fabricante		Cantidad de pruebas
	Aparato médico diagnóstico <i>in-vitro</i>		Temperatura
	Número de catálogo		Consultar instrucciones
	Representante autorizado en la Comunidad Europea		

**IVD**

## Introducción

FT4 (tiroxina libre) es un indicador de la actividad de tiroxina en el cuerpo. Puede también ser medido como tiroxina total, la cual depende de la tiroxina atada al TBG (globulina de unión a la tiroxina)<sup>1</sup>. Bajo condiciones tiroideas normales, mientras la concentración de las proteínas transportadoras se altera, el nivel total T4 cambia para que la concentración de FT4 permanezca constante. Así, la medida de concentraciones de FT4 se correlaciona mejor con el estado clínico que con los niveles de T4 total. Los inmunoensayos de FT4 dependen de la disociación de la T4 unida a proteínas de suero para estabilizar la concentración de FT4 durante las perturbaciones de ensayo. Las diferencias de interensayo en perturbaciones combinadas con variaciones de concentración de la T4 unida a proteínas de suero podrían producir medidas discordantes de FT4<sup>2</sup>.

Por ejemplo, el incremento en el T4 total asociado con el embarazo, los anticonceptivos orales y la terapia con estrógeno ocasionalmente resulta en niveles de T4 total sobre los límites normales mientras que la concentración de FT4 permanece dentro del rango normal de referencia. La función tiroidea anormal enmascarada puede también ocurrir en las condiciones hiper e hipotiroides por alteraciones en la concentración de TGB.

El T4 total puede ser elevado o disminuido por los cambios de la TGB de tal forma que puede observarse un resultado de niveles de referencia normales. De nuevo, la concentración de FT4 típicamente descubre el actual estado clínico del paciente. Tampoco el inmunoensayo FT4 con exactitud establece cambios de FT4 libre durante el embarazo. TT4 y FT4 retienen una relación apropiadamente inversa con TSH a través del embarazo y parece proveer un más fiable estimado de FT4 libre<sup>3</sup>.

## Principio de Medida

Este ensayo está basado en el método competitivo de un paso. La muestra, micropocillos recubiertos de T4 y Anti-T4 marcados con enzima son combinados. Durante la incubación, el derivado T4 recubierto sobre micropocillos y el FT4 presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados con enzima. Después del lavado, un complejo es generado entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima por reacciones inmunológicas. La solución de Substrato es entonces añadida y catalizada por este complejo resultando en una reacción cromogénica. La resultante reacción cromogénica es medida como absorbencia. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de FT4 en la muestra.

## Componentes

### 1. Calibrador A/B/C/D/E/F

6 viales, cada uno conteniendo 1ml de Calibrador A hasta F con las correspondientes concentraciones de FT4 mostradas en la siguiente tabla. La matriz es suero humano conteniendo PBS (fosfato en buffer salino). Contiene una selección de preservativos.

Calibrador	Concentración de FT4 (pmol/l)
A	0
B	5
C	10
D	25
E	50
F	100

Para unidades SI: 1 pmol/l x 0.775= 1ng/dl

### 1. Pocillos Cubiertos

1 placa (96 pruebas) o 2 placas (192 pruebas) de 96 pocillos pre-cubiertos con Derivado T4.

### 2. Enzima Conjugada

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (pruebas) conteniendo 11 ml HRP (horseradish peroxidasa) etiquetado Anti-T4 monoclonal de ratón en buffer de Tris-NaCl conteniendo BSA (albumina de suero bovino). Contiene preservativo 0.2% de preservativo ProClin 300®.

### 3. Solución de Parada

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (192 pruebas) cada una conteniendo 7.5 ml de 1mol/l ácido sulfúrico.

### 4. Solución de Substrato

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (192 pruebas) cada una conteniendo 12 ml de una mezcla compuesta de buffer de TMB y peróxido de hidrógeno.

### 5. Concentrado de Solución de Lavado

1 vial conteniendo 25 ml de solución de lavado PBAS-Tween 40 veces fuerza de trabajo.

### 6. 1 copia de las instrucciones de uso.

7. 2 piezas (96 pruebas) o 4 piezas (192 pruebas) de tapa de placa.

8. 1 bolsa Zip-lock.

## Traceabilidad Metrológica de los Calibradores

Los calibradores del producto están emparejados a un calibrador operativo. El calibrador operativo es producido por métodos gravimétricos a través de la añadidura de antígeno T4 a suero humano libre de hormonas.

## Materiales Requeridos Pero no Suministrados

1. Papel absorbente o papel toalla.
2. Lavadora de banda de microplacas automática.
3. Canal de reactivos desechables.
4. Agua destilada.
5. Incubadora.
6. Agitador magnético.
7. Micropipetas y micropipetas multicanal de volúmenes apropiados.
8. Lector de microplaca.
9. Agitador de placas.

## Advertencias y Precauciones

1. Para uso profesional solamente.
2. Seguir las instrucciones de uso cuidadosamente. La confiabilidad de los resultados del ensayo no puede ser garantizada si hay alguna desviación de las instrucciones dadas en este prospecto.
3. Referirse a la hoja de datos de seguridad del material y a la etiqueta del producto para cualquier riesgo químico que pueda presentarse en este ensayo.

4. Manejar los materiales potencialmente contaminados en forma segura de acuerdo al requerimiento local.
5. PRECAUCIÓN: Los calibradores contienen componentes de origen humano, las cuales han sido probados y encontrados no reactivos para anticuerpos VIH 1 y VIH 2, Anticuerpos HCV y HBsAg por los reactivos IVD marcados CE. Es recomendado que todo material de fuentes humanas sea considerado potencialmente infeccioso. Este ensayo contiene materiales de origen animal. Componentes bovinos originados en países donde no se ha reportado BSE.
6. No fumar, beber, comer o usar cosméticos en el área de trabajo.
7. Vestir ropa de protección y guantes desechables cuando se trate con muestras y reactivos. Lavar las manos después de la operación.
8. Tenga cuidado cuando maneje muestras de pacientes para prevenir contaminaciones cruzadas. La utilización de pipetas desechables o puntas de pipetas es recomendada.
9. Mezclar la muestra en los pocillos completamente agitando y eliminando las burbujas.
10. Realizar el ensayo lejos de condiciones de mal ambiente, por ejemplo, ambientes donde el aire contiene alta concentraciones de gas corrosivo tales como el ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído y etc., o conteniendo polvo.
11. Lavar los pocillos completamente. Cada pocillo debe ser enteramente inyectado con solución de lavado. La fuerza de la inyección, sin embargo, no está supuesto a ser demasiado intensa para evitar inundación. En cada ciclo de lavado, secar los líquidos en cada pocillo. Sumergir la microplaca en papel absorbente para remover gotitas de agua residuales. Es recomendado lavar la microplaca con una lavadora de bandas de microplacas automática.
12. Un fallo al remover la solución adherente adecuadamente en la aspiración o la decantación de los pasos de lavado puede resultar en una pobre replicación y falsos resultados.
13. No toque o riegue el borde de los pocillos con conjugado. No soplar las micropipetas.
14. No utilizar reactivos más allá de la fecha de expiración.
15. No mezclar o usar componentes de kits con diferentes códigos de lote.
16. No utilizar más de 32 pocillos para cada ejecución del ensayo, cuando la pipeta manual es utilizada, complete el pipeteo de todos los calibradores, muestras y controles de veracidad en 5 minutos. Si una pipeta automatizada está disponible utilizar una placa completa de 96 pocillos.
17. Si más de una placa es usada, se recomienda repetir la curva de calibración.
18. Cuando se almacenen los calibradores, asegúrese que cada vial esté seguramente sellado.
19. Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo sea mantenido constante para lograr resultados reproducibles.
20. Es importante calibrar todo el equipo, por ejemplo, micropipetas, lectores de microplacas, lavadoras de bandas de microplacas automáticas, y/o los instrumentos automáticos usados con este dispositivo, y realizar mantenimiento preventivo de rutina.
21. Asegurar que el fondo de la placa esté limpio y seco y que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de la lectura de la placa.
22. La adición de solución de sustrato inicia una reacción cinética, la cual es terminada con la adición de solución de parada. Por lo tanto, el sustrato y la solución de parada deben ser añadidas en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación durante la reacción.
23. Un preciso y exacto pipeteo, así como también seguir el tiempo exacto y los requerimientos de temperatura prescritos son esenciales.

#### Almacenaje

1. Almacenar todos los componentes de 2-8°C. No congelar. Evitar luz fuerte.
2. Colocar los pocillos sin usar en la bolsa *Zip-lock* con el desecante provisto, entonces selle la bolsa *Zip-lock* en el estuche de papel de aluminio con una tapa de placa y regrese a 2-8°C, condiciones bajo las cuales los pocillos permanecerán estables por 2 meses, o hasta la fecha de expiración etiquetada, lo que suceda primero.
3. Sellar y regresar todos los calibradores sin usar a 2-8°C, condiciones bajo las cuales la estabilidad será mantenida por 1 mes, para un uso más largo, guardar los calibradores abiertos en alícuotas y congelar a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento.
4. Sellar y regresar todos los demás reactivos sin usar a 2-8°C, condiciones bajo las cuales la estabilidad será mantenida por 2 meses o hasta la fecha de expiración etiquetada, lo que suceda primero.

#### Muestra

1. Colectar muestras de suero de acuerdo a las correctas prácticas médicas.
2. No utilizar muestras inactivadas por calor. No utilizar preservativos de azida de sodio en las muestras.
3. Sedimentos y sólidos suspendidos en muestras pueden interferir con los resultados de las pruebas los cuales deben ser removidos por centrifugación. Asegurar que la completa formación de coágulo en las muestras de suero hayan tomado lugar previo a la centrifugación. Algunas muestras, especialmente esas de pacientes recibiendo anticoagulantes o terapia trombolítica, pueden exhibir tiempo de coagulación incrementado. Si la muestra es centrifugada antes de completar formas de coágulo, la presencia de fibrina puede provocar resultados erróneos. Asegúrese que las muestras no hayan decaído previo a su uso.
4. Anteriormente al envío, es recomendado que las muestras sean removidas del coágulo, separador de suero o glóbulos rojos.
5. Un procesamiento de muestra insuficiente, o la interrupción de la muestra durante la transportación puede provocar resultados deprimidos.
6. Evitar muestras extremadamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
7. Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas, para un uso más largo, las muestras deben ser tapadas y almacenadas a 2-8°C hasta 48 horas. O congele las muestras que necesiten ser almacenadas o transportadas por más de 48 horas a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento. Mezcle las muestras descongeladas completamente por vórtice a baja velocidad o invirtiendo 10

veces. Inspeccionar visualmente las muestras, observar si hay estratificación o capas, continúe mezclando hasta que las muestras sean visiblemente homogéneas. Después de descongelar, traiga a temperatura ambiente y mezcle bien agitando gentilmente.

8. Centrifugar las muestras descongeladas conteniendo glóbulos rojos o partículas, o que son difusas o nubosas en apariencia previa a su uso para asegurar consistencia en los resultados.
9. Notar que niveles interferentes de fibrina podrían estar presentes en muestras que no tienen partícula obvia o visible.
10. Si no se puede verificar una apropiada colección y preparación de muestra, o si las muestras han sido interrumpidas debido a la transportación o en su manejo, se recomienda un paso adicional de centrifugación. Las condiciones de centrifugación deberían ser suficientes para remover partículas.
11. No diluir muestras ya que el T4 existe de forma libre y combinada en la sangre, y en un estado de equilibrio. Unir variaciones de concentración de proteínas romperá el estado de equilibrio

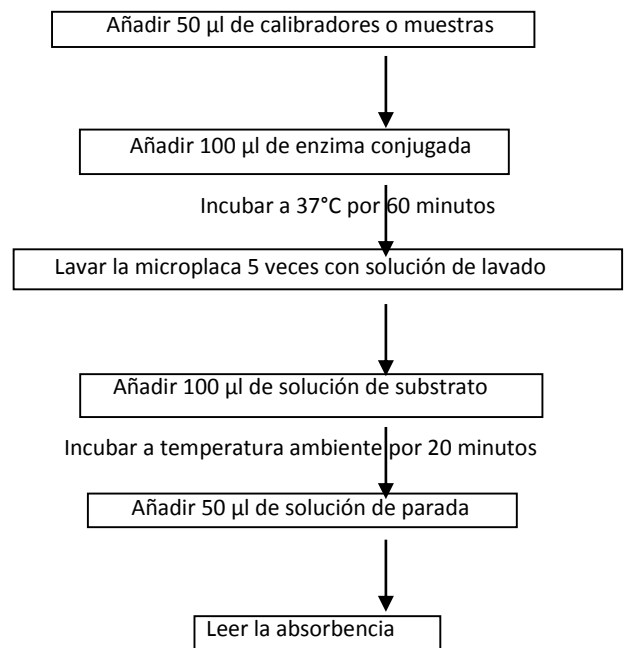
### Preparación de reactivo

1. Traer todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) previo a su uso por al menos 30 minutos. Mezcle todos los reactivos invirtiendo gentilmente previo a su uso. No inducir espuma.
2. Ajustar la incubadora a 37°C.
3. Añadir 1 volumen de solución de lavado concentrado a 30 volúmenes de agua destilada para dar el volumen requerido, y mezclar bien con un agitador magnético. La solución de lavado es estable a temperatura ambiente por 2 meses.

### Procedimiento de medida

1. Utilizar sólo el número de pocillos requeridos y formatear los pocillos de microplacas para cada calibrador y muestra a ser examinada.
2. Añadir 50 µl de calibradores o muestras en cada pocillo.
3. Añadir 100 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
4. Agitar en un agitador de placa por 30 segundos para completamente mezclar el líquido dentro de los pocillos.
5. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37°C por 60 minutos.
6. Descartar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si es con decantación, tapar y secar la placa seca con papel absorbente.
7. Añadir 350 µl de solución de lavado, decante (tape y seque) o aspire. Repetir 4 veces más para un total de 5 lavados. Una lavadora de bandas de microplacas automática puede ser utilizada. Al final del lavado, invertir la placa y remover cualquier solución de lavado residual en el papel absorbente.
8. Añadir 100 µl de solución de substrato a cada pocillo.
9. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad y permitir la reacción por 20 minutos.
10. Añadir 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
11. Agitar en el agitador de placa por 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse que el color azul cambie completamente a amarillo.
12. Dentro de 15 minutos lea la absorbencia de cada pocillo a 450nm utilizando 620 a 630nm como longitud de onda referente en caso de estar disponible.

### Esquema de flujo procedimental



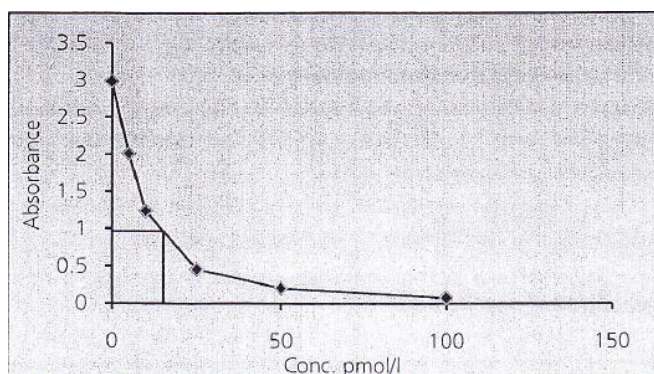
### Resultados de la medida

1. Registre la absorbencia obtenida de la impresión del lector de microplaca como explica el Ejemplo 1. Calcular el promedio de absorbencia de cualquier duplicado de medidas y use el promedio para el siguiente cálculo.
2. Trace la absorbencia contra la concentración en pmol/l para cada calibrador.
3. Dibuje la curva punto por punto a través de los puntos trazados en el papel gráfico lineal. Si una computadora es utilizada, seleccionar punto por punto el método de reducción de datos de ajuste de curva para generar una curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de FT4 para un desconocido, localizar la absorbencia para cada desconocido en el axis vertical (y-axis) del gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva, y lea la concentración (en pmol/l) desde el axis horizontal (x-axis) del gráfico. Si una computadora es utilizada, para determinar la concentración de FT4 para un desconocido, ingresar la absorbencia para cada desconocido y obtener la concentración (en pmol/l). En el siguiente ejemplo, la absorbencia 0.975 interseca la curva de calibración a la concentración de FT4 de 15 pmo/l. (Ver figura 1)

Ejemplo 1

Muestra	Absorbencia	Valor (pmol/l)
Cal A	2.984	0
Cal B	2.006	5
Cal C	1.234	10
Cal D	0.455	25
Cal E	0.208	50
Cal F	0.075	100
Ctrl 1	1.164	11.35
Ctrl 2	0.430	27.53
Muestra	0.975	15

Figura 1



Nota: El dato presentado en el Ejemplo 1 y la Figura 1 son sólo para ilustración y no debe ser usado en lugar de una curva de calibración preparada con cada ensayo. Ctrl 1 y Ctrl 2 no están incluidos en el kit y pueden ser obtenidos de forma separada.

### Procedimiento de Control

El requerimiento de control recomendado para este ensayo es comprar los materiales de control separadamente y probarlos juntos con la muestra en la misma ejecución. El resultado es válido si los valores de control caen dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

### Limitaciones del Procedimiento

1. La intención de esta prueba es una ayuda para el diagnóstico clínico. Conducir este ensayo en conjunto con el examen clínico, la historia médica del paciente y otros resultados.
2. Si los resultados son inconsistentes con la evidencia clínica, se sugiere una prueba adicional para confirmar el resultado.
3. Anticuerpos heterofílicos y factores reumatoides en muestras pueden interferir con los resultados. Anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con inmunoglobulinas de reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos *in vitro*. Los pacientes rutinariamente expuestos a animales o a productos de suero animal pueden tender a esta interferencia y se podrían observar valores incongruentes. Podría requerirse información adicional para el diagnóstico. Esta clase de muestras no son adecuadas para ser probadas por este ensayo.
4. El rendimiento de esta prueba no ha sido establecido con muestras neonatales.
5. La concentración de FT4 en el suero depende de múltiples factores: función de la glándula del hipotálamo y su regulación, concentración de TBG, y la unión del FT4 al TBG. Así, la concentración de FT4 por sí sola no es suficiente para evaluar un estatus clínico.
6. En NTI (severa enfermedad no tiroidea), la evaluación del estatus tiroideo se torna muy difícil. Se recomiendan medidas TSH para identificar la disfunción tiroidea.
7. Los valores de FT4 en el suero pueden ser elevados bajo ciertas condiciones como el embarazo o la administración de contraceptivos orales.
8. La interpretación de FT4 es complicada por una variedad de drogas que pueden afectar la unión del T4 a la hormona tiroidea portadora de proteínas o interferir con su metabolismo al T3.

9. En extrañas condiciones asociadas con extremas variaciones en la capacidad de unión de la albúmina para el T4, tales como FDH (familiar dysalbuminemic hyperthyroxinemia)- puede confundir la evaluación directa del FT4.
10. Los anticuerpos circulando a T4 y los inhibidores de unión de hormonas pueden interferir con el rendimiento de este ensayo.
11. Si un paciente, por alguna razón, tiene una lectura más alta de lo que el calibrador reporta como tal (ej: >100 pmol/l), no trate de diluir las muestras, las variaciones de TGB en diferentes matrices no permitirá a la hormona FT4 diluirse de manera serial.
12. Pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón, ya sea para diagnóstico o terapia pueden desarrollar HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón). HAMA puede producir ya sea valores falsamente altos o falsamente bajos en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón <sup>4,5</sup>. No examine muestras que contengan HAMA con el ensayo FT4.
13. Se ha encontrado un descenso en los valores de FT4 con enfermedades desperdiciadoras de proteínas, ciertas enfermedades del hígado y la administración de testosterona, difenilhidantoina o salicilatos. Una lista con las drogas y condiciones interfirientes que afectan los valores de FT4 ha sido compilada por la Journal of the American Association of Clinical Chemists (Revista de la Asociación Americana de Químicos Clínicos)<sup>6</sup>.

### Referencia Biológica de Intervalo

Un rango normal de 8.5 pmol/l a 22.5 pmol (95% intervalo de confianza) fue obtenido probando muestras de suero de 120 individuos definidos como normales por médicos clínicos. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal el cual puede ser único para la población que sirve dependiendo de factores geográficos, de pacientes, de dietas o ambientales.

### Características de Rendimiento

#### 1. Precisión de medida

Esta prueba está diseñada para tener una precisión de ejecución intraserial de < 10%. 2 plasmas humanos agrupados basados en miembros de panel (1 y 2) fueron probados, usando 1 lote de reactivos, en réplicas de 20. La data de este estudio está resumida en la siguiente tabla:

Miembro de panel	Lote	n	Promedio	SD Ejecución Intraserial	Precisión %CV
1	1	20	18.42	0.38	2.08
2	1	20	32.5	0.95	2.91

Esta prueba está diseñada para tener una precisión entre ejecución de < 15%. 2 plasmas humanos agrupados basados en miembros de panel (1 y 2) fueron probados, usando 2 lotes de reactivos en réplicas de 2, una vez por día a través 20 días de prueba. La data de este estudio está resumida en la siguiente tabla:

Miembro de panel	Lote	n	Promedio	SD Ejecución Interserial	Precisión %CV
1	1	40	14.97	1.04	6.94
2	1	40	22.11	0.62	2.85

## 2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se define como la concentración correspondiente al promedio de absorbencia de 20 réplicas del calibrador A menos 2 desviación estándar, es  $\leq 2.5$  pmol/l.

## 3. Especificidad analítica

Las sustancias mencionadas más abajo, en los niveles de concentración mencionados a su vez, fueron probadas en suero humano libre de hormonas. Los resultados fueron menos de 10 pmol/l.

Interfiriente	Concentración (ng/ml)	Valor medido (pmol/l)
T3	500	4.49
rT3	200	5.29

## 4. Precisión de Medida por Correlación.

Se realizó un estudio de comparación donde las muestras fueron probadas utilizando este ensayo y una prueba FT4 basada en micropartícula, la cual había sido ya marcada CE. La data fue analizada y está resumida en la siguiente tabla:

Método de correlación	Número de muestras	Intercepción	Inclinación	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	219	0.4192	0.9877	0.985

## Literatura de referencia

- Dayan CM. Interpretation of thyroid function tests. Lancet. 2001; 357 (9256) :619 - 624.
- Nelson JC. Underestimates of serum free thyroxine (T4) concentrations by free T4 immunoassays. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1994,79,(1):76-79
- Lee RH, Spencer CA, Meslman JH, et al. Free T4 immunoassays are flawed during pregnancy. American Journal of Obstetrics and Gynecology.2009; 200(3) :260.e1 -260.e6.
- Kinders RJ, Hass GM- Interference in immunoassays by human anti- mouse anti bodies. Eur. J. Cancer. 1990; 26 (5):647 -648.
- Spencer C, Takeuchi M, Kazarosyan M, et al. Interlaboratory/intermethod differences in functional sensitivity of immunometric assays of thyrotropin (TSH) and impact on reliability of measurement of subnormal concentrations of TSH. Clin Chem' 1995;41(3):367 -374.
- Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Ann- Clin. Biochem. 1997; 34 (Pt6): 579-581.