



TIROXINA LIBRE (T4 LIBRE) ENZIMO INMUNOENSAYO KIT DE PRUEBA

**Inmuno ensayo enzimático para la determinación
cuantitativa
Medición de tiroxina libre (T4L) en humanos.
Suero.**

(Solo para uso de diagnóstico in-vitro)

Intención de uso

Para la medición cuantitativa de la tiroxina libre (T4L) en el suero humano.

Introducción

La Tiroxina, la hormona tiroidea principal, circula en la sangre casi completamente unidos a proteínas transportadoras. El soporte principal es globulina fijadora de tiroxina (TBG). Sin embargo, sólo la parte libre (no unida) de la tiroxina es el responsable de la acción biológica. Además, las concentraciones de las proteínas transportadoras se alteran en muchos cuadros clínicos, tales como el embarazo. En la función tiroidea normal, como las concentraciones de las proteínas transportadoras alteran, el de nivel de tiroxina total cambia, así la concentración de tiroxina libre se mantiene constante. Por lo tanto, la medición de las concentraciones de tiroxina libre se correlaciona

mejor con el estado clínico de los niveles de tiroxina total.

Por ejemplo, el aumento de la tiroxina total asociada con el embarazo, los anticonceptivos orales y la terapia con estrógenos ocasionalmente alteran los niveles de T4 sobre el límite normal mientras que la concentración de tiroxina libre permanece en su rango normal de referencia. El enmascaramiento de la función tiroidea anormal también puede ocurrir tanto en condiciones de hígido e hipotiroidismo por alteraciones en la concentración de TBG. La T4 total puede ser elevada o disminuida cambios por cambios de TBG como los niveles normales de referencia de resultado. Nuevamente, la concentración de tiroxina libre por lo general revela el estado clínico del paciente real.

Principio de la Prueba

En este ensayo de T4 libre, una cierta cantidad de analógico T4 está revestida en pocillos de microtitulación y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-T4 anticuerpo conjugado con rábano picante.

Durante la incubación analógica T4 en pocillos de microtitulación y la presencia de T4 libre en la muestra, el estándar compite para al anti-T4 anticuerpo monoclonal-peroxidasa de rábano conjugada. Después de 60 minutos de incubación a 37° C, los pocillos deben lavarse 5 veces por el buffer de lavado para eliminar anti-T4-anticuerpo

conjugado no consolidado. Solución de sustrato y la solución de cromógeno se añade y se incuba durante 20 minutos, resultando en el desarrollo de color azul. El desarrollo del color se detiene con la adición de solución de stop, y la absorbancia se mide espectrofotométricamente a 450 nm. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional, dentro del rango de trabajo de la prueba, a la concentración de T4 libre en la muestra. La concentración de T4 libre en una muestra de pacientes o el control se determina por interpolación de la curva estándar.

Almacenamiento de los kits de Prueba e Instrumentación

1. Kits de prueba sin abrir deben ser almacenados a 2-8°C a su recepción y la placa de microtitulación debe mantenerse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición al aire húmedo. El kit de prueba puede utilizarse antes de la fecha de vencimiento (un año desde la fecha de fabricación). Consulte la fecha de vencimiento en la etiqueta del envase.
2. Kits de prueba ya abiertos se podrán mantener estable hasta la fecha de expiración indicada, siempre que se almacene como se ha indicado anteriormente.
3. Un lector de placas de microtitulación con un ancho de banda de 10nm o menos, y una densidad óptica de 0-2 DO o mayor a la longitud de onda de 450nm es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

Recogida y preparación de la muestra

1. La sangre debe extraerse utilizando técnicas estándar de punción venosa y el suero debe ser separado de las células rojas de la sangre tan pronto como sea posible. Evite extremadamente hemolíticos, las muestras lipémicas o turbias.
2. Muestras de plasma recogidas en tubos con EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con los procedimientos de prueba y deben ser evitados.
3. Las muestras deben ser protegidas y se pueden almacenar hasta 48 horas a 2-8°C, antes del ensayo. Las muestras a conservar por más tiempo se pueden congelar a -20°C. Muestras descongeladas se deben mezclar antes de la prueba.
4. No use muestras que han permanecido a temperatura ambiente durante más de 8 horas.

Materiales y componentes

Materiales proporcionados en este kit:

1. T4 analógico-recubierto 96 pocillos de placas de microtitulación.
2. T4-anticuerpo conjugado enzimático, 11 ml.
3. Configuración T4 libre estándar de referencia, contiene: O, 5,0, 10, 25, 50 y 100 pmol / L. líquido, listo para usar.
4. Solución de sustrato, 7,5 ml.
5. Solución de cromógeno, 7,5 ml.
6. Solución de stop, 7,5 ml
7. Solución de lavado concentrado, 25 ml (40X).

Materiales requeridos pero no proporcionados:

1. Agua destilada.
2. Pipetas de precisión: 0.05ml, 0.2ml.
3. Tips de pipetas desechables.
4. Lector de pocillos de microtitulación.
5. Mezclador Vortex o equivalente.
6. Papel absorbente.
7. Papel gráfico.

Preparación de reactivos

- Todos los reactivos deben alcanzar una temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
- Para preparar la solución de lavado: agregar 25 ml de solución de lavado concentrado en 975ml de agua destilada, y mezcle bien. El concentrado de solución de lavado es estable a temperatura ambiente por lo menos durante una semana.
- **Conservar a 2-8°C hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 2 meses y se pueden congelar a -20°C para el almacenamiento a largo plazo.**

Procedimiento del ensayo

1. Asegure el número deseado de pocillos recubiertos en el soporte. Haga una hoja de datos con identificación de la muestra.
2. Dispense 50µl de las normas de T4 libre, muestras y controles en los pocillos apropiados.

3. Dispense 10µl de reactivo de conjugado de enzima en cada pocillo.
4. **Mezclar bien 30 segundos.**
5. **Es muy importante tener una mezcla completa este paso.**
6. Se incubará a 37°C durante 60 minutos.
7. Retire la mezcla de incubación accionando el contenido de la placa en un recipiente de residuos.
8. Enjuague y sacuda los pocillos de microtitulación 5 veces con solución de lavado.
9. Escurra los pocillos enérgicamente sobre papel absorbente para eliminar todas las gotas de agua residual.
10. Dispense 50µl de solución de cromógeno en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 5 segundos.
11. Dispense 50µl de solución de sustrato en cada pocillo. Mezclar suavemente durante 5 segundos.
12. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos sin agitación.
13. Detener la reacción añadiendo 50µl de solución de stop a cada pocillo.
14. Mezclar suavemente 15 segundos.
15. **Es muy importante asegurarse de que el color azul cambie a color amarillo por completo.**
16. Leer la densidad óptica (DO) a 450nm con un lector de microtitulación y 15 minutos.

Nota importante:

1. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión.
2. Se recomienda que no se utilicen más de 32 pocillos para cada ensayo, si utiliza pipeteo manual, complete el pipeteo de todas las normas, muestras y controles dentro de 5 minutos. Un plato lleno de 96 pocillos puede ser utilizado si el pipeteo automatizado está disponible.
3. Se recomienda la duplicación de todos los estándares y las muestras, aunque no es obligatorio.

Cálculo de los resultados

1. Calcular el promedio de los valores de absorbancia (A450) para cada set de normas de referencia, controles y muestras.
2. Recomendamos el uso de software adecuado para calcular los resultados. Si el software no está disponible, construya una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia contra su concentración en ng/ml en papel gráfico lineal, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (x).
3. Recomendamos el uso de software adecuado para calcular los resultados. Si el software no está disponible, la construcción de una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia contra su concentración en ng / ml el papel de gráfico lineal, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (x) el eje.

Valores esperados

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales sobre la base de la población de pacientes.

Limitaciones

- No utilizar EDTA y citrato de sodio como anticoagulante al inhibir la reacción enzimática.
- Como con todos los inmunoensayos, los resultados de esta prueba puede ser influenciados por factores presentes en las muestras de algunos pacientes. Los reactivos de este ensayo han sido formulados para minimizar la interferencia de anticuerpos heterófilos y de la proteína de unión no específica. Sin embargo, al igual que con otros métodos de inmunoensayo de dos sitios, los resultados individuales de la muestra pueden verse afectados.
- Para el diagnóstico, los resultados obtenidos con esta prueba se deben utilizar siempre en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente, y otros hallazgos.
- Las instrucciones del procedimiento se deben seguir exactamente, cualquier modificación del procedimiento puede cambiar los resultados.
- El uso de reactivos, material desechable o piezas de recambio que no sean los suministrados por un distribuidor autorizado pueden producir resultados incorrectos.

Referencias

1. Barker, S B., "Determination of Protein Bound Iodine". Journal Biological Chemistry, 173, 175(1948)
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R. S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine", J. Clinical Endocrinol. 33, 865 (1971)
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", Clinical Chemistry, 21, 3660(1975).

ATLAS MEDICAL**PPI231A01****Version B (01.04.2009)**