

T4L

(Tiroxina Libre)

Uso Previsto:

Inmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de la tiroxina libre en suero humano.

Resumen:

La hormona tiroidea tiroxina (T4) forma parte fisiológicamente del circuito regulador de la glándula tiroidea y tiene un efecto sobre el metabolismo general. La fracción mayor de la tiroxina total se une a proteínas de transporte (TBG, prealbúmina y albúmina). La tiroxina libre (T4L) es la tiroxina fisiológicamente activa.

La determinación de tiroxina libre es un elemento importante en la rutina de clínica diagnósticos. La T4 libre se mide junto con la TSH cuando de la función tiroidea se sospechan trastornos. La determinación de T4L también es adecuada para la monitorización terapia tirosupresiva.

La determinación de T4 libre tiene la ventaja de ser independiente de los cambios en las concentraciones y propiedades de unión de las proteínas; adicional, por lo tanto, no es necesaria la determinación de un parámetro de unión (absorción de T, TBG).

Principio de Prueba:

Duración total de la prueba: 80 minutos.

- La muestra, los micropocillos recubiertos con derivado de T4 y la enzima etiquetada Anti-T4 combinadas.
- Durante la incubación, el derivado de T4 recubre los micropocillos y la T4L presente en la muestra compete por unirse a los anticuerpos marcados con enzimas.
- Después del lavado, se genera un complejo entre la fase sólida y la enzima unida a los anticuerpos por reacciones inmunológicas.
- La solución de sustrato luego se agrega y es catalizada por este complejo, lo que resulta en una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia
- La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de T4L en la muestra.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pocillos recubiertos previamente con derivado T4.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; Con concentraciones indicadas en cada envase.
- Conjugado enzimático, 1 vial, 6,0 ml de HRP (peroxidasa de rábano picante) etiquetado Anti-T4 monoclonal de ratón en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene 0,2% de conservante ProClin300.
- Sustrato, 1 vial, 11ml, listo para usar, (tetrametilbencidina) TMB.
- Solución de parada, 1 vial, 6,0 ml de ácido sulfúrico 1 mol/l.
- Concentrado de solución de lavado, 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), PBS-Tween.
- Inserto: 1 copia.
- Tapa Placa: 1 pieza.

Materiales Requeridos (Pero no provistos):

- Lector de microplacas con capacidad de absorción de longitudes de onda de 450 nm y 630 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión menor a 1,5%.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro. Solo para uso profesional.
- Se ha encontrado que todos los productos que contienen suero o plasma humano no son reactivos para HBsAg, HCV y HIVI/II. Pero todos los productos deben ser catalogados como peligros biológicos potenciales en uso y eliminación.
- Mezclar bien la muestra en los pocillos mediante agitación y eliminar las burbujas.
- Realice las pruebas lejos de malas condiciones ambientales. P.ej. aire ambiente que contiene gas corrosivo de alta concentración, como ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído, etc., o que contenga polvo.
- Lave los pocillos por completo. Cada pocillo debe llenarse completamente con solución de lavado.
- Sin embargo, evite que la fuerza en el llenado sea demasiado intensa para evitar desbordamiento. En cada ciclo de lavado, seque los líquidos de cada pocillo. Golpee la microplaca sobre papel absorbente para eliminar las gotas de residuos de agua. Se recomienda a lave la microplaca con un lavador automático de tiras de microplacas.
- No eliminar adecuadamente la solución adherida en la aspiración o decantación durante el lavado pueden dar resultados deficientes o falsos.
- No utilice reactivos más allá de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- No mezcle ni utilice componentes de kits con diferentes códigos de lote.

- Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para lograr resultados reproducibles.
- Asegúrese de que la parte inferior del plato esté limpia y seca.
- Asegúrese de que no haya burbujas en la superficie del líquido antes de leer el plato.
- El sustrato y la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.

Almacenamiento:

- Almacenar a 2-8°C.
- Coloque los pocillos no utilizados en la bolsa de aluminio con cierre hermético y regréselo a 2-8°C, bajo cuyas condiciones los pozos permanecerán estables por 2 meses, o hasta que la fecha de caducidad.
- Selle y devuelva los calibradores no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 1 mes, para un uso prolongado, almacene los calibradores y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación y descongelación.
- Selle y devuelva todos los demás reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones la estabilidad se mantendrá durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad etiquetada.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Recoger muestras de suero de acuerdo con las prácticas médicas correctas.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C durante no más de 8 horas. Estable para 7 días a 2-8°C, y 1 mes a -20°C. Recuperación dentro del 90-110 % del valor del suero o pendiente 0.9-1.1. Congelar una sola vez.
- Los tipos de muestras enumerados se analizaron con una selección de tubos de recogida de muestras que estaban disponibles comercialmente en el momento de la prueba, es decir, no todos los disponibles. Se probaron tubos de todos los fabricantes. Sistemas de recolección de muestras de varios los fabricantes pueden contener diferentes materiales que podrían afectar los resultados de la prueba en algunos casos. Al procesar muestras en tubos primarios (obtención de muestras), siga las instrucciones del fabricante del tubo. Centrifugar muestras que contengan precipitados antes de realizar el ensayo. No utilice muestras inactivadas por calor. No utilice muestras y controles estabilizados con azida.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba que debe ser eliminado por centrifugación. Asegúrese de que la formación completa del coágulo en las muestras de suero ha tenido lugar antes de la centrifugación. algunas muestras, especialmente los de pacientes que reciben terapia anticoagulante o trombolítica, pueden aumentar el tiempo de coagulación. Si la muestra se centrifuga antes de formar coágulos completos, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos. Asegúrese de que las muestras no estén deterioradas antes de su uso.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.
- Tenga en cuenta que los niveles de interferencia de fibrina pueden estar presentes en muestras que no tienen partículas evidentes o visibles.
- Si no se puede verificar la recolección y preparación adecuada de muestras, o si las muestras han sido interrumpidas debido al transporte o manejo de las mismas. Se recomienda centrifugarlas. Las condiciones de centrifugado deben ser suficiente para eliminar las partículas.
- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente. Temperatura (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos suavemente invertir antes de su uso.
- Ajuste la incubadora a 37°C.
- Prepare el concentrado de solución de lavado antes de la medición. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.
- No use el sustrato si se ve azul.
- No utilice reactivos que estén contaminados o que tengan crecimiento bacteriano.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener muestras de controles en los niveles bajo, normal y rango elevado para monitorear el rendimiento de la prueba. Debe haber controles tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizado.

El requisito de controles recomendados para este ensayo es utilizar un control por separado y probarlos junto las muestras dentro de la misma corrida. El resultado es válido si los valores de control están dentro de la concentración rangos impresos en las etiquetas.

Procedimiento de Prueba:

- Utilice sólo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra a realizar.
- Agregue 50 µl de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Agregue 50 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agite suavemente la microplaca durante 30 segundos para mezclar.
- Cubra la placa con una tapa para placas e incube a 37°C durante 60 minutos.
- Desechar el contenido de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.

• Agregue 350 µl de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Un lavador automático de tiras de microplacas puede ser usado. Al final del lavado, invierta la placa y elimine cualquier residuo solución de lavado sobre papel absorbente.

- Añada 100 µl de sustrato a cada pocillo.
 - Incube a temperatura ambiente (18-25°C) en la oscuridad para que reaccione durante 20 minutos. No agite la placa después de agregar el sustrato.
 - Agregue 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
 - Agite durante 15 a 20 segundos para mezclar el líquido dentro de los pocillos. Importante: Asegúrese de que el color azul cambie a amarillo por completo.
 - Lea la absorbancia de cada pozo a 450 nm (usando 620 a 630 nm como longitud de onda secundaria para minimizar las imperfecciones del pocillo) en un lector de microplacas.
- Los resultados deben leerse dentro de los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parada.

Cálculo:

- Registre la absorbancia obtenida de la impresión del lector de microplacas.
 - Calcule la absorbancia media de cualquier medición duplicada y utilice la media para el siguiente cálculo.
 - Trace el logaritmo común de la absorbancia frente a la concentración en pmol/L para cada calibrador.
 - Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrado lineal.
- Se sugiere el método de puntos para generar una curva de calibración.

Los siguientes datos son solo para demostración y no se pueden usar en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Muestra	Valor de la muestra (pmol/L)	Absorbancia
Calibrador A	0	3.084
Calibrador B	5	2.121
Calibrador C	10	1.842
Calibrador D	20	0.915
Calibrador E	50	0.557
Calibrador F	100	0.253
Control 1	10.29	1.824
Control 2	33.38	0.795
Muestra	17.02	1.408

Limitaciones e Interferencia:

- El ensayo no se ve afectado por la ictericia (bilirrubina < 600 µmol/L o < 35 mg/dL), hemólisis (Hb < 0,559 mmol/L o < 0,9 g/dL), lipemia (Intralipid < 1200 mg/dL), y biotina < 94 nmol/L o < 23 ng/mL.
- Criterio: Recuperación dentro del ± 10 % del valor inicial.
- Los anticuerpos heterofílicos y los factores reumatoides en las muestras pueden interferir con resultados de la prueba. Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con el reactivo inmunoglobulinas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro. Los pacientes rutinariamente expuestos a animales o productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y pueden observarse valores anómalos. La información adicional puede ser requerida para el diagnóstico. Este tipo de muestras no es adecuado para ser probado por este ensayo.
- No se ha establecido el rendimiento de esta prueba con muestras neonatales.
- En NTI grave (enfermedad no tiroidea), la evaluación del estado de la tiroides se vuelve muy difícil. Se recomiendan mediciones de TSH para identificar la disfunción en las tiroides.
- Los valores séricos de T4L pueden estar elevados en condiciones como el embarazo o administración de anticonceptivos orales.
- La interpretación de T4L es complicada por una variedad de medicamentos que pueden afectar la unión de T4 a las proteínas transportadoras de hormona tiroidea o interferir con su metabolismo a T3. En condiciones raras asociadas con variaciones extremas en la unión de albúmina la capacidad de T4 - como FDH (hipertiroxemia disalbuminémica familiar)- la evaluación directa de FT4 puede ser engañosa.
- Los anticuerpos circulantes contra la T4 y los inhibidores de unión a hormonas pueden interferir con el rendimiento de la prueba.
- Si un paciente, por alguna razón, lee más alto que el informe de calibrador más alto como tal (por ejemplo, > 100 pmol/l). No intente diluir las muestras. Variaciones de TBG en diferentes matrices no permitirán que la hormona FT4 se diluya.
- Se encuentra una disminución en los valores de FT4 con enfermedades que pierden proteínas, ciertas enfermedades y administración de testosterona, difenilhidantoína o salicatos. La tabla de drogas y condiciones que interfieren, que afectan los valores de FT4, ha sido compilado por el Diario de la Asociación Americana de Químicos Clínicos. Pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón para cualquier diagnóstico o la terapia puede desarrollar HAMA (anticuerpos anti-ratón humanos). HAMA puede producir valores falsos altos o bajos en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Es posible que se requiera información adicional para diagnóstico.

Cálculos:

El analizador automáticamente calcula la concentración de cada muestra.

Conversión de factores:
 pmol/L x 0.077688 = ng/dL.
 ng/dL x 12.872 = pmol/L.
 pmol/L x 0.77688 = ng/L.

Límites y Rangos:

Rango de Medición:

2 - 100 pmol/L o 0.155 - 7.77 ng/mL (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Valores por debajo del límite de detección se reporta como < 2 pmol/L o < 0.155 ng/mL. Valores por encima del rango de medición se notifican como > 100 pmol/L o 7.77 ng/mL.

Límites Inferiores de Medición:

Límite inferior de detección: 2 pmol/L o 0.155 ng/mL.
 El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir desde cero. Se calcula como el valor que dan dos desviaciones estándar por encima del de el estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1 + 2 SD, estudio de reproducibilidad, n=21).

Valores Esperados:

11.5 - 23.8 pmol/L o 0.893 - 1.849 ng/dL.
 Estos valores corresponden a los porcentajes entre 2,5 y 97,5 de los resultados obtenidos de un total de 777 muestras de sujetos sanos examinados.
 No hemos estudiado los intervalos de referencia en niños, adolescentes y mujeres embarazadas.
 Cada laboratorio debe investigar la transferibilidad de los valores esperados a sus propias poblaciones de pacientes y, si es necesario, determinar sus propios rangos de referencia.

Datos de Rendimiento Específicos:

Los datos de rendimiento representativos se dan a continuación. Resultados obtenidos en forma individual, los laboratorios pueden diferir.

Precisión:

La precisión se determinó utilizando reactivos, sueros humanos agrupados y controles en un protocolo modificado (EP5-A) del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Instituto): 2 veces al día durante 20 días (n = 40). Los siguientes resultados fueron obtenidos:

Muestra	Media pmol/L	Reproducibilidad		Precisión Intermedia	
		SD pmol/L	CV %	SD pmol/L	CV %
Suero 1	14.36	1.10	7.66	1.25	8.72
Suero 2	28.51	1.95	6.84	2.13	7.46
Suero 3	45.44	2.96	6.51	3.32	7.31
PC Universal 1	17.33	1.28	7.39	1.19	6.88
PC Universal 2	32.15	2.31	7.19	2.23	6.93

*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución.

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo de T4L (y) con el Roche Cobas T4L (x) utilizando muestras dieron las siguientes correlaciones:
 Número de muestras medidas: 91
 Regresión Lineal.
 $y = 1.0595x + 1.5237$
 $r = 0.9695$
 Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 4 y 100 pmol/L.

Especificidad Analítica:

Para los anticuerpos monoclonales utilizados, se encontraron las siguientes reactividades cruzadas: L-T4 y D-T4 100%; L-T3 < 1.89%; D-T3 1.44%; 3 iodo-L-tirosina 0.002%; L-T2 < 3.5 - diiodo-L-tirosina 0.008%.

Referencias:

1. Wheeler MH, Lazarus JH. Diseases of the Thyroid. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall, 1994;107-115.
2. Pfannenstiel P, Saller B. Schilddrüsenkrankheiten Diagnose und Therapie. Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH 1991;2:43-62,72-89.
3. Ekins RP. Measurement of free hormones in blood. Endocr Rev 1990;11:5.
4. Ekins RP, Ellis SM. The radioimmunoassay of free thyroid hormones in serum. In Robbins J, Braverman LE (eds). Thyroid research, Proceedings of the Seventh International Thyroid Conference, Boston. Amsterdam, Excerpta Medica 1975:597.

