

T4

(Tiroxina)

Uso Previsto:

Ensayo inmunoadsorbente ligado a enzimas (ELISA) para la determinación cuantitativa in vitro de la tiroxina total (T4) en suero humano. El ensayo es útil en el diagnóstico y tratamiento de trastornos de la tiroides.

Resumen:

La hormona tiroxina (T4) es el principal producto secretado por la glándula tiroides y es un componente integral del sistema de regulación hipotálamo-hipófisis anterior-tiroides. Tiene la función de influir anabólicamente en el metabolismo. La tiroxina se forma en una reacción de acoplamiento de dos moléculas DIT (3,5-diyodotirosina) en la glándula tiroides. Se almacena ligado a la tiroglobulina en la luz de los folículos tiroideos y se secreta a demanda bajo la influencia de la TSH.²

La mayor parte (> 99 %) de la tiroxina total (T4) en el suero está presente unida a proteínas. Dado que las concentraciones de las proteínas de transporte en el suero están sujetas a efectos exógenos y endógenos, el estado de las proteínas de unión también debe tenerse en cuenta en la evaluación de la concentración de hormona tiroidea en el suero. Si esto se ignora, los cambios en las proteínas de unión (por ejemplo, debido a preparaciones que contienen estrógenos, durante el embarazo o en presencia de un síndrome nefrótico, etc.) pueden conducir a evaluaciones erróneas del estado metabólico de la tiroides.^{3,4,5,6,7}

La determinación de T4 se puede utilizar para las siguientes indicaciones: la detección de hipertiroidismo, la detección de hipotiroidismo primario y secundario y el seguimiento de la terapia de supresión de TSH.⁸

El ensayo T4 emplea un principio de prueba competitivo con un anticuerpo dirigido específicamente contra T4. T4 endógena, liberada por la acción del ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS).

Principio de Prueba:

Duración total del ensayo: 80 minutos.

- Se combinan la muestra, los micropocillos recubiertos con derivado de T4 y el Anti-T4 marcado con enzima.
- Durante la incubación, el derivado de T4 que recubre los micropocillos y la T4 presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados con la enzima.
- Después del lavado, se genera un complejo entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a enzimas por reacciones inmunológicas.
- Luego se agrega la solución de sustrato y este complejo la cataliza, lo que da como resultado una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbancia.
- La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de T4 en la muestra.
- del color es inversamente proporcional a la cantidad de T3 en la muestra.

Materiales Proporcionados:

- Microplaca recubierta, 8 x 12 tiras, 96 pozos, pre-recubierta con derivado de T4.
- Calibradores, 6 viales de 1 ml cada uno, listos para usar; Con concentraciones indicadas en cada envase.
 - Conjugado de enzima T4, 1 vial, 6,0 ml 1 vial, 6,0 ml de T4 monoclonal de ratón marcada con HRP (peroxidasa de rábano picante) en tampón Tris-NaCl que contiene BSA (albúmina de suero bovino). Contiene 0,2% de conservante ProClin300. SNA 1,5 mg/mL.
 - 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: símbolo 1 vial, 25 ml (concentrado 40X), solución de lavado 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 620 nm.
- Lavador de microplacas.
- Incubadora.
- Sacudidor de platos.
- Micropipetas y micropipetas multicanal que suministran 50 µl con una precisión superior al 1,5 %.
- Papel absorbente.
- Agua destilada

Precauciones y Advertencias:

- Sólo para uso diagnóstico in vitro.
- Tome las precauciones normales requeridas para el manejo de todos los reactivos de laboratorio.
- La eliminación de todos los materiales de desecho debe realizarse de acuerdo con las pautas locales.
- 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.
- Todos los desechos de muestras y reacciones deben considerarse potencialmente biopeligrosos. La manipulación de las muestras y los

residuos de la reacción debe realizarse de acuerdo con las normativas y directrices locales.

- La solución de parada contiene ácido sulfúrico, que puede causar quemaduras graves. En caso de contacto con los ojos, lávense inmediata y abundantemente con agua y acúdase a un médico.
- Los ácidos neutralizados y otros desechos líquidos deben descontaminarse agregando un volumen suficiente de hipoclorito de sodio para obtener una concentración final de al menos 1,0%. Puede ser necesaria la exposición a hipoclorito de sodio al 1,0 % durante 30 minutos para garantizar una descontaminación eficaz.
- Algunos reactivos contienen 0,05%-0,2% ProClin 300 que puede causar sensibilización por contacto con la piel, por lo que debe evitarse. Los reactivos y sus recipientes deben desecharse de forma segura. En caso de ingestión, acúdase inmediatamente al médico y muéstrese la etiqueta o el envase.
- El sustrato tiene un efecto irritante sobre la piel y las mucosas. En caso de posible contacto, lavar los ojos con abundante agua y la piel con jabón y abundante agua. Lave los objetos contaminados antes de reutilizarlos. Si es inhalado, lleve a la persona al aire libre.
- Para obtener información sobre las sustancias peligrosas incluidas en el kit, consulte la Hoja de datos de seguridad de materiales (MSDS), que está disponible a pedido.
- No fume, beba, coma ni se aplique cosméticos en el área de trabajo.
- No pipetear con la boca. Use ropa protectora, guantes desechables y protección para los ojos y la cara al manipular muestras y reactivos. Lávese las manos después de su uso.
- Si alguno de los reactivos entra en contacto con la piel o los ojos, lavar abundantemente la zona con agua.

Almacenamiento y Estabilidad:

- Almacenar a 2-8°C.
- Selle y devuelva los reactivos no utilizados a 2-8°C, en cuyas condiciones se mantendrá la estabilidad durante 2 meses o hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, lo que ocurra primero.

Recolección y Preparación de Muestras:

- Se recomienda suero humano para esta prueba.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas. Estable durante 7 días a 2-8°C y 1 mes a -20°C. Congelar una sola vez.
- No utilice muestras inactivadas por calor.
- Los sedimentos y los sólidos en suspensión en las muestras pueden interferir con el resultado de la prueba, por lo que se deben eliminar mediante centrifugación. Asegúrese de que se haya formado completamente el coágulo en las muestras de suero antes de la centrifugación.
- Evite muestras muy hemolíticas, lipémicas o turbias.

Calibración:

El T4 ELISA ha sido estandarizado contra el ensayo Elecsys T4 que ha sido verificado por ID-GC/MS (cromatografía de gases con dilución de isótopos, espectrometría de masas) en varios materiales de control.⁹ Se recomienda la recalibración cuando se utiliza un nuevo lote de reactivo o los controles de calidad están fuera del rango especificado.

Control de Calidad:

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo a niveles en el rango bajo, normal y elevado para monitorear el rendimiento del ensayo. Los controles deben tratarse como desconocidos y los valores deben determinarse en cada procedimiento de prueba realizado. El requisito de control recomendado para este ensayo es utilizar un control de veracidad por separado y analizarlos junto con las muestras en la misma serie. El resultado es válido si los valores de control se encuentran dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

Solución de Lavado (Dilución 40X):

Agregue agua desionizada al concentrado de solución de lavado concentrado 40X. Diluya 25 ml de solución de lavado concentrada con 975 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 1000 ml. Estable durante 2 meses a temperatura ambiente.

Procedimiento de Prueba:

- Asegúrese de que las muestras, los calibradores y los controles de los pacientes estén a temperatura ambiente (18-25°C) antes de la medición. Mezcle todos los reactivos invirtiéndolos suavemente antes de usarlos.
- Utilice solo el número de pocillos necesarios e identifique los pocillos de las microplacas para cada calibrador y muestra que vaya a analizar.
 - Agregue 50 µL de calibradores o muestras a cada pocillo.
 - Agregue 50 µL de conjugado enzimático 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 se decanta, golpee y seque la placa con papel absorbente.
 - Agregue 350 µl de solución de lavado, decante (golpee y seque) o aspire. Repita 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede utilizar un lavador automático de tiras de microplacas. Al final del lavado, invierta la placa y saque la solución de lavado residual sobre papel absorbente.
 - Agregue 100 µL de sustrato a cada pocillo.

- Cubra e 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. Es importante asegurarse de que el color azul cambie a amarillo por completo.
- Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (usando de 620 a 630 nm como longitud de onda de referencia para minimizar las imperfecciones de los pocillos) 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.
- Grafique el logaritmo común de absorbancia frente a la concentración en µg/dL para cada calibrador.
- Dibuje la curva que mejor se ajuste a través de los puntos trazados en papel cuadrado lineal. Se sugiere el método punto a punto para generar una curva de calibración.

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

Muestra	Valor de la Muestra (µg/dL)	Absorbancia
Calibrador A	0	3.077
Calibrador B	2.5	2.172
Calibrador C	5	1.414
Calibrador D	10	0.777
Calibrador E	15	0.334
Calibrador F	30	0.191
Control 1	8.7	0.934
Control 2	14.41	0.386
Muestra	9.32	0.863

Limitaciones e Interferencias:

- El ensayo no se ve afectado por 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 reumatoideos en las muestras pueden interferir con los resultados de la prueba. Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas reactivas, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Los pacientes expuestos rutinariamente a animales o productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y se pueden detectar valores anómalos observado. Es posible que se requiera información adicional para el diagnóstico. Este tipo de muestras no es adecuado para ser analizadas por este ensayo.
- No se ha establecido el rendimiento de esta prueba con muestras neonatales.
- La concentración sérica de T4 depende de una multiplicidad de factores: la función de la glándula del hipotálamo y su regulación, la concentración de TBG y la unión de T4 a TBG. Por lo tanto, la concentración total de T3 por sí sola no es suficiente para evaluar el estado clínico.
- Los pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón para diagnóstico o terapia pueden desarrollar HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón). HAMA puede producir valores falsamente altos o falsamente bajos en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales de ratón. Es posible que se requiera información adicional para el diagnóstico.

Cálculo:

El analizador calcula automáticamente la concentración de analito de cada muestra (ya sea en nmol/L, µg/dL or µg/L).

Factores de Conversión:

nmol/L x 0.077688 = µg/dL
 µg/dL x 12.872 = nmol/L
 nmol/L x 0.77688 = µg/L

Rango de Medición:

0,50-30 µg/dL o 6,43-385,80 nmol/L (definido por el límite inferior de detección y el máximo de la curva maestra). Los valores por debajo del límite de detección se notifican como <0,5 µg/dL o <6,43 nmol/L. Los valores por encima del rango de medición se notifican como >30 µg/dL o >385,80 nmol/L.

Límite Inferior de Detección

0,50 µg/dL o 6,43 nmol/L

El límite de detección representa el nivel de analito más bajo que se puede distinguir de cero. Se calcula como el valor que se encuentra dos desviaciones estándar por encima del estándar más bajo (calibrador maestro, estándar 1+2 SD, estudio de repetibilidad, n=21).

Valores Esperados:

4,5-13,8 µg/dL o 57,9-177,6 nmol/L

No hemos estudiado los intervalos de referencia en niños, adolescentes y mujeres embarazadas. Cada laboratorio debe investigar la transferibilidad de los valores esperados a su propia población 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. Los resultados obtenidos en laboratorios individuales pueden diferir.

Precisión:

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

Muestra	Media µg/dL	Reproducibilidad		Precisión Intermedia	
		SD µg/dL	CV %	SD µg/dL	CV %
Suero 1	3.94	0.36	9.14	0.35	8.88
Suero 2	9.27	0.51	5.50	0.68	7.32
Suero 3	15.84	0.72	4.55	0.79	4.99
PC Universal 1	7.33	0.32	4.36	0.27	3.68
PC Universal 2	15.64	0.57	3.64	0.85	5.43

*Reproducibilidad= Precisión dentro de la ejecución.

Comparación de Métodos:

Una comparación del ensayo T4 (y) con Elecsys T4 (x) usando 91 muestras clínicas arrojó las siguientes correlaciones:

regresión lineal

y = 1,0296x - 1,2318

r = 0,9689

Las concentraciones de la muestra estaban entre aprox. 1 y 25 µg/dL.

Especificidad Analítica:

Para el derivado de anticuerpo utilizado, se encontraron las siguientes reactividades cruzadas: L-T4 y D-T4 100 %; L-T3 1,89 %; D-T3 1,44 %; 3-yodo-L-tirosina 0,002 %; 3,5-diyodo-L-tirosina 0,008 %

Sensibilidad Funcional:

0,58 µg/dL o 7,47 nmol/L

La sensibilidad funcional es la concentración de analito más baja que se puede medir de forma reproducible con un CV de precisión intermedia de ≤ 20 %.

Referencias:

1. Wheeler MH, Lazarus JH. Diseases of the Thyroid. London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman and Hall Medical, 1994:108-115.
2. Pfannenstiel P, Saller B. Schilddrüsenkrankheiten Diagnose und Therapie. Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH, 1995;2:43-62,97-106.
3. Wenzel KW. Pharmacological interference with in vitro tests of thyroid function. Metabolism 1981;30(7):717-732.
4. Burrow GN. Thyroid status in normal pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 1990;71:274-275.
5. Lazarus JH, Othman S. Thyroid disease in relation to pregnancy. Clin Endocrinol 1991;34:91-98.
6. Fisher DA. Physiological variations in thyroid hormones; physiological and pathophysiological considerations. Clinical Chemistry 1996;42:1,135-139.
7. Burrow GN, Fisher DA, Larsen PR. Maternal and fetal thyroid function. N Engl J Med 1994;331:1072-1078.
8. Nelson JC, Wilcox RB. Analytical performance of free and total thyroxine assays. Clinical Chemistry 1996;42:1,146-154.
9. ThienpontLM, DeBrabandereVI, StöckID, et al. Development of a New Method for the Determination of Thyroxine in Serum Based on Isotope Dilution Gas Chromatography Mass Spectrometry. Biological Mass Spectrometry 1994;23:475-482.

