



### Tiroxina total (T4)

Código de producto: 275-300

**Uso previsto: Determinación cuantitativa de la concentración de Tiroxina total (T4) en suero o plasma humano por prueba inmunológica de quimioluminiscencia en microplaca (CLIA)**

### RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA:

La medición de las concentraciones de T4 está generalmente relacionada como una herramienta útil en el diagnóstico de la evaluación tiroidea. Esta importancia ha sido el motor para el desarrollo de técnicas inmunológicas en las últimas tres décadas. La evolución de estos métodos han avanzado desde la empírica prueba del yodo enlazado a proteína (PBI) al teóricamente sofisticado radioinmunoensayo.

El presente método inmunológico provee una técnica con una sensibilidad óptima que requiere poca manipulación técnica. En este método, el suero de referencia, muestra del paciente o control se agrega primero a una microplaca de pocillos, luego se agrega conjugado enzima-T4 y luego se mezclan. La resultante es una reacción de competición entre el conjugado enzimático y la T4 nativa por un número limitado de anticuerpos inmovilizados en los pocillos.

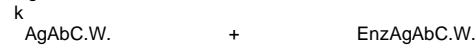
Después de completarse el período de incubación necesaria, los anticuerpos enlazados al conjugado enzima-T4 son separados de los conjugados enzima-T4 no enlazados por aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie de los pocillos es cuantificada por reacción con un sustrato adecuado para producir luz.

El empleo de varios sueros de referencia con concentración de T4 conocida permiten construir un gráfico de actividad y concentración. De la comparación con la curva respectiva, la actividad de un suero desconocido puede ser correlacionada con la concentración de T4.

### PRINCIPIO

### Inmunoensayo de quimioluminiscencia (tipo 5)

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo de fase sólida incluyen anticuerpos inmovilizados, conjugado antígeno-enzima y antígeno nativo. Luego de mezclar estos reactivos resulta una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno por un número limitado de sitios insolubles. La interacción se ilustra con la siguiente ecuación:



$k$  - Un AbC.W. = anticuerpos monoespecíficos inmovilizados (cantidad constante)  
 $\text{Ag}$  = Antígeno Nativo (cantidad variable)  
 $\text{EnzAg}$  = enzima-antígeno conjugado (cantidad constante)  
 $\text{AgAbC.W.}$  = Complejo Antígeno-Anticuerpo  
 $\text{EnzAg AbC.W.}$  = Conjugado enzima-antígeno-anticuerpo  
 $k$  = constante de velocidad de la Asociación  
 $ak$  = tasa constante de disociación  
 $-Ak = k / k$  = constante de equilibrio a-uno

Después que se consigue el equilibrio la fracción de anticuerpo enlazado es separada del antígeno no enlazado por decantación o aspiración. La actividad enzimática determinada por la reacción con un sustrato que genera luz en la fracción de anticuerpo enlazado es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Utilizando diferentes sueros de referencia de concentración de antígeno conocido se puede generar una curva en la cual se puede determinar la concentración del antígeno.

### REACTIVOS

Materiales Provistos:

- Suero de referencia humano** – 1 ml/vial – Icons A-F Seis(6) viales de sueros de referencia para tiroxina en niveles de 0(A), 2.5(B), 5.0(C), 10.0(D), 15.0(E) y 25.0(F) ug/ml. Almacenar de 2 – 8° C Se agregó preservativo.
- Trazador T4 Total - 1.5 ml/vial Icon** Un (1) vial de peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugado en proteína matriz. Se agrega un preservativo. Almacenar de 2 – 8° C .
- Buffer Trazador T3/T4 Total - 13 ml/vial Icon** Un (1) botella conteniendo buffer, colorante rojo, preservante inhibidores de proteínas. Almacenar de 2 – 8° C
- Placa de 96 pocillos de reacción con T4** Microplaca de 96 pocillos cubiertos con anticuerpos anti tiroxina de oveja y empacada en bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacenar de 2 – 8° C

- Solución de lavado concentrado – 20 ml** Un (1) vial conteniendo surfactante en buffer salino. Se agregó preservativo. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- Reactivo A – 7 ml/vial** Una (1) botella conteniendo luminol en buffer. Almacenar de 2 – 8° C
- Reactivo B – 7 ml/vial** Una (1) botella conteniendo Peróxido de Hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en buffer. Almacenar de 2 – 8° C
- Inserto de instrucciones.**

**Nota 1:** No usar los reactivos después de su fecha de expiración.

**Nota 2:** Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando se almacenan de 2 a 8° C

### PRECAUCIONES:

*Para uso de diagnóstico in Vitro.*

*No es para usar externamente o internamente en humanos o animales.*

Todos los productos que contienen suero humano han sido probados no-reactivos a Hepatitis B antígeno de superficie, HIV 1 y 2 y HCV por los exámenes de la FDA. Puesto que ninguna prueba conocida puede asegurar completamente la ausencia de agentes infecciosos, todos los productos que contienen suero humano deben ser manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades infecciosas.

Los procedimientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio para el manejo de productos sanguíneos se pueden encontrar en el Centro de Control de Enfermedades del Instituto Nacional de Salud, "Bioseguridad en Microbiología y Laboratorio Biomédicos" 2° Ed. 1988 HHS. Publicación N° (CDC) 88-8395

### RECOLECCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Recoger la muestra (s) por punción venosa en diez (10) ml de silicona, de tubos de vacío (s) o de tubos de vacío (s) que contiene EDTA o heparina. Las precauciones habituales en la recogida de muestras de punción venosa debe ser observada. Separar las células rojas de la sangre por centrifugación el suero o plasma para el uso del procedimiento de T4 total. Muestra (s) pueden ser refrigerados a 2-8° C durante un período máximo de 48 horas. Si la muestra (s) no se puede probar dentro de las 48 horas, la muestra (s) puede ser almacenado a temperaturas de -20° C hasta por 30 días. Antes del ensayo, que las muestras alcancen la temperatura ambiente (20° C - 27° C). Cuando se vaya a analizar por duplicado se necesita 0,05 ml de la muestra.

**Materiales requeridos pero no Provistos:**

- Pipeta capaz de dispensar 25 ul con precisión de 1.5 %.
- Dispensador de capacidad: 0.100 ml y a.350 ml con precisión de 1.5 % (opcional)
- Dispensador ajustable de capacidad: de 20 a 200 ul y 200 a 2000 ul para las diluciones del sustrato y del conjugado.
- Lavador de microplacas o una pizeta (opcional).
- Luminómetro de microplacas.
- Tubos de ensayo para diluir el conjugado enzimático y reactivos A y B
- Papel absorbente para secar los pocillos de la microplacas.
- Cubierta plástica para tapar las microplacas durante las incubaciones.
- Aspirador al vacío (opcional) para los procesos de lavado.
- Reloj cronómetro.
- materiales de control de calidad..

### PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

**1.- Solución conjugado T4-enzima** - Trazador de trabajo: Diluir el trazador T4 total 1:11 con bufer trazador T3/T4 en un depósito limpio. Por ejemplo diluir 160 ul de conjugado en 1.6 ml de bufer para 16 pocillos; usar dentro de las 24 horas. Almacenar de + 2° a + 8° C.

Fórmula general:

Cantidad de bufer requerido= numero de pocillos \* 0.1  
Cantidad de enzima T4 necesaria= # de pocillo \* 0.01

### 2.- Bufer de lavado:

Diluir el contenido de la solución de lavado concentrada en 1,000 ml de agua destilada o desionizada en un depósito adecuado. Almacenar a temperatura ambiente de + 20° a + 27° C

### 3.- Solución de reactivo de trabajo:

Almacenar de + 2° a + 8° C. Determinar la cantidad de reactivo necesario y preparar mezclando en proporciones iguales el reactivo A y reactivo B en un depósito limpio.

Por ejemplo agregar 1 ml de A y 1 ml de B para 2 tiras de 8 pocillos.

Deseché la porción no utilizada si no se usa dentro de 36 horas después de la mezcla. Si la utilización completa de los reactivos se prevé, dentro de las limitaciones de tiempo anterior, verter el contenido del Reactivo B en el Reactivo A y etiquetar adecuadamente.

### PROCEDIMIENTO DE ENSAYO:

Antes de proceder con el ensayo llevar todos los reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20 a + 27° C)

1. Marcar los micropocillos para cada suero de referencia, control y muestra de paciente a ser ensayada en duplicado.  
NOTA: Cubrir los pocillos sin usar con el sellador de placas, sellar en la bolsa de plástico con desecante, y almacenar a 2-8 °C
2. Pipetear 0.025 ml (25 ul) del apropiado suero de referencia, control o muestra en los pocillos asignados.
3. Agregar 0.100 ml (100 ul) del conjugado Trazador de trabajo, enzima T4 a todos los pocillos. (ver sección Preparación de reactivos)
4. Mover suavemente la placa por 20 a 30 segundos para mezclar y cubrir.
5. Incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
6. Descartar el contenido de las microplacas por decantación o aspiración. Si se decanta dar un golpecito y secar con papel absorbente.
7. Agregar 350 ul de bufer de lavado (ver preparación de reactivos) decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede usar un lavador manual o automático. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una pizeta, llenar cada pocillo por inclinación del depósito (evitando formar burbujas) para dispensar la solución de lavado. Decantar la sol. De lavado y repetir el procedimiento 4 veces adicionales.
8. Agregar 0.100 ml (100 ul) de reactivo de trabajo a todos los pocillos (ver Preparación de reactivos). Siempre agregar los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias en el tiempo de reacción de cada pocillo.
9. Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos en oscuridad.
10. Leer las unidades relativas de luz en cada pocillo, por 0.5 – 1.0 segundos / pocillo, usando un luminómetro de microplacas. Los resultados deberán ser leídos entre los 30 minutos después e agregar la solución de sustrato.

**NOTA:** Para repetir el análisis de las muestras con concentraciones mayores a 25 ug/ml pipetear 12.5 ul de la muestra y 12.5 ul del suero de referencia en el pocillo de muestra (esto mantiene una concentración de proteína uniforme) Multiplicar el valor obtenido por 2 para obtener la concentración de T4

#### CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles en los niveles en el rango de hipotiroidismo, hipertiroidismo y eutiroidismo para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizada. listas de control de calidad debe mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para determinar las tendencias. El laboratorio individual debe establecer los límites aceptables de rendimiento del ensayo. Otros

parámetros que deben ser controlados incluyen los 80, 50 y 20% de las intersecciones de la curva estándar de la reproducibilidad-to-run. Además, la intensidad de luz máxima debe ser coherente con la experiencia pasada. desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar cambios inadvertidos en condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. reactivos frescos deben ser usados para determinar la razón de las variaciones

#### RESULTADOS:

Se usa una curva de respuesta para determinar la concentración de T4 en la muestra del paciente.

1. Registrar el URL (Unidad de Luz Relativa) obtenido en el impreso del lector de microplaca como se indica en el ejemplo 1.
2. Plotear las URL para cada suero de referencia versus la concentración de T4 correspondiente en ng/ml en un papel lineal gráfico.
3. Dibujar la curva que mejor se ajusta a través de los puntos ploteados.
4. Para determinar la concentración de T4 en una muestra desconocida localizar el promedio del URL de cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección en la curva y leer la concentración (en ug/ml) en el eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido deben ser promediados según se indica) En el siguiente ejemplo el promedio del URL (49979) del desconocido intersecta la curva de calibración en la concentración de T4 de (6.6 ug/ml) (ver la figura 1)

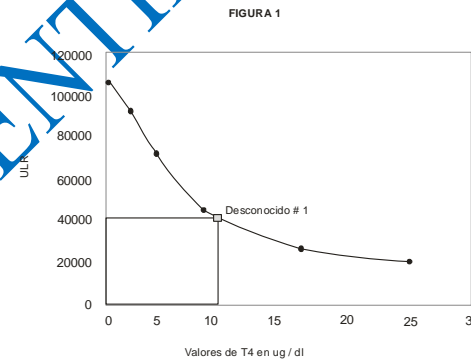
**NOTA 1** El software de reducción de datos de computadora designado para las pruebas de quimioluminiscencia también se puede usar para la reducción de datos. Los duplicados del desconocido deben ser promediados como se indica (ver figura 1)

**NOTA 2** Monobind puede asistir al laboratorio en la compra e implementación de equipo / software para medir e interpretar datos de quimioluminiscencia.

Muestra ID	Pozo #	URL's (A)	Media URL (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1	99846	100000	0
	B1	100154		
Cal B	C1	75846	76437	2
	D1	77028		
Cal C	E1	57556	56647	5
	F1	55738		
Cal D	G1	39680	39196	10
	H1	38712		
Cal E	A2	27634	27833	15
	B2	28033		

Cal F	C2	15381	15417	25
	D2	15454		
Ctrl. 1	E2	53675	53593	5.8
	F2	53512		
Ctrl. 2	G2	29566	29355	14.0
	H2	29144		
Patient 1	A3	500095	49979	6.6
	B3	49864		

\* Los datos presentados en el Ejemplo 1 y Figura 1 es sólo para ilustración y no debe ser utilizado en lugar de una curva dosis-respuesta preparada con cada ensayo. Además, los RLU de los calibradores han sido normalizados a 100,000 RLU's para el calibrador A (mayor salida de luz). Esta conversión minimiza las diferencias causadas por la eficiencia de los distintos instrumentos que se pueden utilizar para medir la producción de luz



#### PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para considerar válidos los resultados de los ensayos se deben considerar los siguientes criterios:

1. La curva de respuesta de dosis debe estar entre los parámetros establecidos.
2. Cuatro de seis controles de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos

#### ANÁLISIS DE RIESGO

##### A. Performance de la prueba

1. Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo se mantenga constante para asegurarnos resultados reproducibles.
2. El pipeteo de la muestra no se debe extender más allá de 10 minutos para evitar que el ensayo se amontone.
3. Muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas no deben ser usadas.
4. Si se va a usar más de una placa se recomienda repetir la curva de respuesta de dosis.
5. La adición de reactivo inicia la reacción cinética, por lo tanto los reactivos deben ser agregados en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
6. Fallas al remover la solución adherida en los pocillos, durante la aspiración o decantación del lavado puede resultar en una pobre replicación y resultados falsos..
7. Usar componentes del mismo lote. No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
8. Un pipeteado preciso , así como seguir los tiempo exactos y temperaturas requeridas son esenciales. Cualquier alteración de las instrucciones de uso de Monobind pueden concluir en resultados imprecisos.
9. Se deben aplicar todos los estándares nacionales, regulaciones y leyes así como los procedimientos de las buenas prácticas de laboratorio para asegurarnos un correcto uso de los instrumentos.
10. Es importante calibrar todos los equipos Ej. Pipetas, lectores, lavadores y/o los equipos automatizados usados con este kit. Así como también seguir los programas de mantenimiento preventivo.
11. Análisis de riesgo – como los requeridos por la directiva CE 98/79/EC ; para este u otros kits hechos por Monobind pueden ser solicitados por email a: [monobind@monobind.com](mailto:monobind@monobind.com)

##### B. Interpretación

- 1 Los resultados de laboratorio sólo son sólo un aspecto para la determinación de la atención al paciente y no debe ser la única base para la terapia, particularmente si el conflicto resultados con otros determinantes.
- 2 Para los resultados de pruebas válidas, los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos de la lista y los requisitos de ensayo.
3. Si los kits de pruebas se alteran, por ejemplo, si se mezclan partes de diferentes kits, lo que podría producir resultados falsos en las pruebas, o si los resultados son mal interpretados, Monobind no tendrá ninguna responsabilidad.
- 4 Si la reducción de datos de la computadora controlada se utiliza para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores previstos para los calibradores comprendidos dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- 5 La concentración total de tiroxina en suero depende de una multiplicidad de factores: la función de la glándula tiroides y su regulación, la globulina fijadora de tiroxina (TBG), la concentración y la unión de

tiroxina a TBG (3, 4). Por lo tanto, la concentración de tiroxina total por sí sola no es suficiente para evaluar el estado clínico.

6 Los valores totales de tiroxina en suero puede estar elevada en condiciones tales como el embarazo o la administración de anticonceptivos orales. Una prueba de captación de T3 se puede realizar para estimar la concentración de TBG en relación con el fin de determinar si la T4 elevada es causada por la variación de TBG.

7 Una disminución en los valores de tiroxina total se encuentra con enfermedades perdiendo proteínas, algunas enfermedades del hígado y la administración de testosterona difenilhidantoína o salicilatos. Un cuadro de medicamentos que interfieren y condiciones que afectan a los valores totales de tiroxina ha sido compilada por la revista de la Asociación Americana de Químicos Clínicos

#### RANGO DE VALORES ESPERADO

Un estudio en población adulta determinó que los valores de T4 total por el método de AccuLite CLIA fueron:

TABLE I

#### Valores esperados para T4 Acculite CLIA (en ug/dl)

Media (X):	7.5	8.3
Desviación Estandar:	1.6	1.8
Rangos esperados:	4.3 – 10.7	4.7 – 11.9

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de rangos de valores los cuales pueden ser esperados por un método determinado para una población de "personas normales" depende de una multiplicidad de factores : la especificidad del método ,la población examinada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de valores esperados.

#### CARACTERISTICAS DE PERFORMANCE

##### A. Precisión:

La precisión de las pruebas de T4 Monobind Acculite CLIA fueron determinados por análisis en tres diferentes niveles de control de suero. El número, valor medio, desviación estandar y coeficiente de variación de cada uno de estos controles de suero se presentan en las tabla 2 y tabla 3.

TABLA 2

#### Prueba de precisión interno( ng/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	16	3.7	0.25	6.8%
Normal	16	8.6	0.31	3.6%

Alto	16	14.5	0.82	5.7%
------	----	------	------	------

TABLA 3

#### Prueba de precisión externo ( ng/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	10	3.4	0.22	6.4%
Normal	10	8.8	0.37	4.3%
Alto	10	14.2	0.77	5.5%

\* Medido en 10 experimentos por duplicado.

##### B. Exactitud

La T4 AccuLite™ método CLIA fue comparado con un método de microplacas Elisa. Las muestras biológicas de las poblaciones de hipotiroidismo, hipertiroidismo eutiroideos y se utilizaron (los valores oscilaron entre 0.5µg/dl - 28µg/dl). El número total de especímenes fue 120. La ecuación de regresión del cuadrado y el coeficiente de correlación se calcularon para este método en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

#### Análisis de regresión cuadrada

Método	Media	Coef Co.
Este método	8.37	0.965
Referencia (Y)	8.25	

$$Y = -0.18 + 0.965(X)$$

##### C. Sensibilidad

El procedimiento de tiroxina tiene una sensibilidad de 25 pg. Esto es equivalente a una muestra que contiene una concentración de 0,1 ug / dl. La sensibilidad se determinó mediante la determinación de la variabilidad de los g 0 / dl de suero calibrador y el uso de la 2σ (95% de certeza) estadística para el cálculo de la dosis mínima

##### D. Especificidad

La reactividad cruzada (especificidad) del anticuerpo tiroxina a las sustancias seleccionadas se evaluó mediante la adición de la sustancia que interfería a una matriz de suero en varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia interfiere con la dosis de tiroxina necesaria para desplazar a la misma cantidad de trazador

Sustancia	Reactividad cruzada	Conc.
l tiroxina	1.0000	-
d-tiroxina	0.9800	10ug/dl
d triiodotironina	0.0150	100ug/dl

l triiodotironina	0.0300	100ug/dl
iodotiroxina	0.0001	100ug/dl
diiodotiroxina	0.0001	100ug/dl
diiodotironina	0.0001	100ug/dl

#### REFERENCIAS:

- Barker, SB, "Determinación de yodo a las proteínas." Diario de Química Biológica 173-175. (1948)
- Chopra, Salomón IJ, DH, un puerto RS Ho, "Un radioinmunoanálisis de tiroxina." J Endocrinol Clínica 33, 865. (1971)
- Young, DS, Pestaner, LC, y Gilberman, U., "Efectos de las drogas en pruebas de laboratorio clínico." Química Clínica 21, 3660. (1975)
- Sterling, L., Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad de la tiroidea, Prensa Cleveland CRC p. 19-51. (1975)
- Rae P, J Farrar, G Beckett, Toft A, "Evaluación del estado de la tiroidea en personas de edad avanzada." Med británico. Jour 307, 177-180. (1993)
- Charles ND, "Las causas de muchos de hipertiroidismo subclínico". Tiroides 6, 391-396. (1996)
- Chou FF, PW Wang, Huang SC, "los resultados de la tiroidectomía subtotal para la enfermedad de Graves. Tiroides 9, 253-256.
- Muzzaffari EL, Gharib H, "la terapia de supresión de tiroxina en pacientes con enfermedad tiroidea nodular." Ann Intern Med 128, 386-394. (1998)
- Attwood CE, Seddon RM, Probert DE: "La relación T4/TBG y la investigación de la función tiroidea." Clin Biochem 11, 218. (1978)
- Jain R, RM Isaac, ME Gottschalk et al: hipotiroidismo central I'Transient como causa del retraso del crecimiento en recién nacidos y lactantes J. Endocrinología Invertir 17, 631-637.. (1994)

Versión: 3 Fecha: 112.210 ACA: 0383

Cat #: 275-300

#### INSTRUMENTOS Y APLICACIONES

Los inmunoensayos de Monobind son productos diseñados para trabajar en ambos ambientes de laboratorio Manual y Automatizado. AccuBind y AccuLite son compatibles con cualquier equipo abierto incluyendo analizadores químicos, lectores y lavadores de microplaca. Podemos tener la aplicación desarrollada para su equipo en particular, visite nuestra página en Internet.

Monobind ofrece varios instrumentos el Impuls 2 Luminómetro CLIA Lector de placa, diseñado mano a mano con nuestros productos y capacidad de 2 puntos de calibración. Visite nuestro sitio en Internet para mayor información.



Tel 949-951-2665  
Fax: 949-951-3539  
Email: info@monobind.com  
En la web: www.monobind.com



2 °C 8 °C