



DiaMetra



# FT4

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de FT4 en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver la etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO038

## USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de FT4 en suero o plasma humano.

El kit FT4 está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hormona tiroidea, tiroxina (T4), es producida por la glándula tiroides. El yodo es un componente importante en la síntesis. La forma mayormente presente en la sangre de las hormonas tiroideas es la tiroxina (T4). La tiroxina se convierte en T3 activa (tres-cuatro veces más potente que la T4) dentro de las células por la deiodinasa (5'-iodinasa).

La globulina que transporta la tiroxina (TGB) es la proteína transportadora de la hormona tiroidea circulante. Solo una fracción muy pequeña de la hormona está libre (FT4 0,03%). Cuando la hormona de la tiroides está vinculada, no está activa, la relación FT3/FT4 es muy importante. Por esta razón, la medición de T4 total en la sangre puede ser engañosa.

La concentración de la hormona tiroidea libre en la sangre está regulada por un mecanismo de retroalimentación negativa, con la participación de la TSH. La unión de la T4 a la TBG juega un papel clave en este mecanismo y los cambios más significativos en la capacidad de la unión de la T4 son el resultado de alteraciones en la TBG. Los cambios en los niveles circulantes de TBG causan un aumento o disminución en la proporción a la concentración de T4 total. Sin embargo, la medición de T4 libre en suero no esta afectada por los cambios en los niveles de la TBG y por lo tanto se correlaciona bien con la función tiroidea. Los factores responsables de las discrepancias entre los niveles séricos de T4 total y la función tiroidea, son la concentración de la TBG, las hormonas estrogénicas (embarazo, anticonceptivos orales y estrógenos) y las drogas que se unen a la TBG. Las hormonas tiroideas actúan en el organismo aumentando el metabolismo basal, afectan a la síntesis de proteínas y aumentan la sensibilidad del cuerpo a las catecolaminas (como la adrenalina). Las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo y la diferenciación de las células del cuerpo humano.

Estas hormonas también regulan el metabolismo de las proteínas, de las grasas y de los hidratos de carbono, y están involucradas en la regulación del

uso de los residuos energéticos por parte de las células. Los estímulos fisiológicos y patológicos influyen en la síntesis de la hormona tiroidea. Un exceso de T3 circulante causa el síndrome clínico de tirotoxicosis o hipertiroidismo.

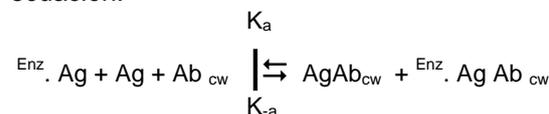
Tanto la T3 como la T4 se emplean en el tratamiento de la carencia de hormonas tiroideas (hipotiroidismo).

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los reactivos esenciales requeridos para este inmunoensayo enzimático de fase sólida incluyen anticuerpos anti-T4 recubiertos en los pocillos, conjugado antígeno-enzima y antígeno de T4 nativo.

Al mezclar, en los micropocillos recubiertos, el conjugado antígeno-enzima y un suero que contiene el antígeno de T4 libre nativo, se produce una reacción competitiva entre el antígeno de T4 libre nativo y el conjugado por un número limitado de sitios de unión no solubilizados.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



Ab<sub>cw</sub>: Anticuerpo monoespecífico inmovilizado (cantidad constante)

Ag: Antígeno nativo (cantidad variable)

Enz. Ag.: Conjugado enzima-antígeno (cantidad constante)

Ag Ab<sub>cw</sub>: Complejo antígeno-anticuerpo

Enz. Ag Ab<sub>cw</sub>: Complejo enzima-antígeno anticuerpo-conjugado

K<sub>a</sub>: Constante de asociación

K<sub>a</sub>: Constante de disociación

K = k<sub>a</sub> / k<sub>a</sub>: Constante de equilibrio

Tras lograr el equilibrio, el conjugado unido a la fase sólida se separa de la fracción de conjugado libre mediante decantación o aspiración. La actividad del conjugado unido a la fase sólida es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre (FT4). Utilizando los estándares con una concentración conocida de antígeno se puede crear una curva en la que es posible interpolar una muestra con concentración desconocida de FT4.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Estándares (STD) de FT4 (6 frascos, 1 mL cada uno)

STD <sub>0</sub>	REF DCE002/3806-0
STD <sub>1</sub>	REF DCE002/3807-0
STD <sub>2</sub>	REF DCE002/3808-0
STD <sub>3</sub>	REF DCE002/3809-0
STD <sub>4</sub>	REF DCE002/3810-0
STD <sub>5</sub>	REF DCE002/3811-0

2. FT4 Control (1 frasco, 1 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Quality Control Report)

REF DCE045/3803-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

FT4 conjugada con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/3802-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti-T4 absorbido en la microplaca

REF DCE002/3803-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm)

#### Nota

Conservar todos los reactivos a 2±8 °C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar.

#### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los estándares y de los controles se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH 1 y 2, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los estándares y lo control positivo deben

manipularse como material potencialmente infeccioso.

- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- La concentración de la tiroxina total en suero depende de múltiples factores: de la función de la glándula tiroides y de su regulación, de la globulina que transporta la tiroxina (TGB), y de la unión de la tiroxina a la TBG. Sin embargo, la concentración de tiroxina total no es suficiente por sí sola para controlar el estado clínico.
- Los valores de tiroxina total en suero pueden aumentar durante el embarazo o por el suministro de anticonceptivos orales. La revista de la Asociación americana de química clínica (*Journal of the American Association of Clinical Chemists*) ha recopilado una tabla de las drogas que interfieren y las condiciones en las que los valores de tiroxina total se ven afectados.
- No usar para la detección en neonatos

#### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los estándares (S<sub>0</sub>...S<sub>5</sub>)

Los estándares son referencias de suero humano de FT4 con concentraciones aproximadas de:

	S <sub>0</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>
ng/dL	0	0,3	0,95	2,1	3,6	7,0

Los niveles exactos se indican en las etiquetas para cada lote específico. Conservar a 2÷8 °C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50X) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación de la muestra

Obtener la muestra mediante una jeringa de 10 mL en tubos de silicona. Observar las precauciones habituales en la obtención de las muestras. Separar las células de glóbulos rojos mediante centrifugado y usar el suero para la determinación de la FT4. Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2÷8°C (durante un período máximo de 48 horas). Si no se va a comprobar en un plazo de 48 horas, puede conservarse a -20°C hasta 30 días. Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,10 mL de la muestra.

### 6.4. Procedimiento

Antes de proceder a la determinación, esperar a que todos los reactivos, sueros de referencia y controles se encuentren a temperatura ambiente (22÷28°C).

Reactivo	Estándar	Muestra/ Control	Blanco
Estándares S0-S5	50 µL		
Muestra/ Control		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
Agitar con cuidado la microplaca durante 20-30 segundos y cubrirla. Incubar 1h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar a temperatura ambiente (22÷28°C) durante 15 minutos, protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Mezclar con cuidado durante 15-20 segundos. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente al blanco en un plazo de 30 minutos desde la adición de la solución de parada.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva estándar para la reproducibilidad interensayo. Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

### 7.1. Interpretación de los resultados

Si para calcular los resultados se ha usado el ordenador, es imprescindible que los valores de los calibradores se encuentren dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Notas

Absorbancia  $S_0 = > 1.0A$

### 8.2. Absorbancia media

Calcular la extinción media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva estándar ( $S_0 - S_5$ ) y de cada muestra.

### 8.3. Curva estándar

Trazar el gráfico de la absorbancia ( $E_m$ ) en función de las concentraciones de los estándares ( $S_0 - S_5$ ). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos estándar (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.4. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en ng/dL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Se ha utilizado un estudio de población adulta eutiroidea para determinar los valores esperados para el FT4 EIA KIT.

	Media (ng/dL)	SD	Rango (ng/dL)
Adultos	1,4	0,6	0,8 – 2,0
Embarazo	1,5	0,7	0,8 – 2,2

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es  $\leq 10,98\%$ .

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es  $\leq 10,81\%$ .

### 10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de FT4 medible es 0,05 ng/dL con un límite de confianza del 95%.

### 10.3. Especificidad

La reactividad cruzada del anticuerpo de tiroxina utilizado para el EIA Free T4 con las sustancias seleccionadas se evaluó añadiendo cantidades masivas de la sustancia interferente a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó derivando un índice entre las dosis de la sustancia interferente y la dosis de tiroxina necesaria para desplazar la misma cantidad de conjugado:

Sustancia	Reaccion cruzada	Concentración
I -Thyroxine	1,0000	---
d -Thyroxine	0,9800	10 $\mu\text{g/dL}$
I-Triiodo-thyronine	0,0300	100 $\mu\text{g/dL}$
d-Triiodo-thyronine	0,0150	100 $\mu\text{g/dL}$
Monoiodo-Tyrosine	N/D	100 $\mu\text{g/mL}$
Diiodo-Tyrosine	N/D	100 $\mu\text{g/mL}$
Triiodothyroacetic Acid	N/D	100 $\mu\text{g/mL}$
Tetraiodothyroacetic Acid	0,0001	100 $\mu\text{g/mL}$

### 10.4. Correlación con referencia RIA

El kit FT4 (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 197 muestras de suero. La curva de regresión es: (FT4 RIA) =  $0,952 * (\text{FT4 Diametra}) + 0,103$   
 $r^2 = 0,920$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

- Barker, S.B, JBC 173, 175, (1948)
- Chopra, I.J, et al J. Clinical Endocrinol., 33, 865 (1971)
- Young, D.S, et al Clinical Chemistry 21, 3660 (1975)
- Sterling, L, Cleveland CRC Press, P. 19-51 (1975)

Ed 07/2011

DCM038-8

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Garibaldi, 18  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. 0039-02-2139184 – 02-26921595  
Fax 0039-02-2133354.

**Manufactory:** Via Giustozzi 35/35a – Z.I Paciana –  
06034 FOLIGNO (PG) Italy  
Tel. 0039-0742-24851  
Fax 0039-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

**IT***Spiegazione dei simboli***GB***Explanation of symbols***FR***Explication des symboles***ES***Significado de los símbolos***DE***Verwendete Symbole***PT***Explicação dos símbolos*

	DE In vitro Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico in vitro FR Dispositif medical de diagnostic in vitro GB In vitro Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico in vitro PT Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE Hergestellt von ES Fabricante FR Fabriqué par GB Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
<b>REF</b>	DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue GB Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricación FR Date de fabrication GB Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes del último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) GB Use by (last day of the month) IT Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) PT Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE Biogefährdung ES Riesgo biológico FR Risque biologique GB Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones de uso FR Consulter le mode d'emploi GB Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código del lote FR Numero de lot GB Batch code IT Codice del lotto PT Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "h" Tests ES Contenido suficiente para "h" ensayos FR Contenu suffisant pour "h" tests GB Contains sufficient for "h" tests IT Contenuto sufficiente per "h" saggi PT Contém o suficiente para "h" testes		DE Inhalt ES Contenido del kit FR Contenu du coffret GB Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Límites de temperatura FR Limites de température de conservation GB Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		

	<b>DIA.METRA SRL</b>	
Mod. PIS	<b>PACKAGING INFORMATION SHEET</b>	

## **SUGERENCIAS PARA LA SOLUCIÓN DE PROBLEMAS/TROUBLESHOOTING**

### **ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**

#### **No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

#### **Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

#### **Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

#### **CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

#### **CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

## **ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**

### **No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

### **Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

### **Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

### **Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation