



fT4 Elisa

KAPDB4340



History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
140611/1	200224/1
Multilanguage IFU	Addition of the following sentence at the end of the English IFU: "Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: https://www.diasource-diagnostics.com/ "
Old Diasource logo	New Diasource logo
No IVD symbol	IVD symbol added
LOT : 140611/1	Version: 200224/1
PI number : 1701226	No PI number
No manufacturer symbol	Manufacturer symbol added



fT4 Elisa

For the direct quantitative determination of Free Thyroxine by enzyme immunoassay in human serum.

KAPDB4340 IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Free Thyroxine by enzyme immunoassay in human serum.
For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, control and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of fT4 in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of fT4 in patient samples and controls can be directly read.

The labeled T4 (conjugate) employed in this assay system has shown no binding properties towards thyroxine-binding globulin (TBG) and human serum albumin (HSA). The binding sites on the microwell plates are designed to be of a low binding-capacity in order not to disturb the equilibrium between T4 and its carrying proteins. The assay is carried out under normal physiological conditions of pH, temperature and ionic strength.

CLINICAL APPLICATIONS

Thyroxine (T4), the principal thyroid hormone, circulates in blood almost completely bound to carrier proteins. However, only the free (unbound) fraction of thyroxine is considered to be biologically active. The main carriers of thyroxine are thyroxine-binding globulin (TBG), pre-albumin and albumin. The measurement of free thyroxine (fT4) levels correlate better with the clinical status than total thyroxine levels.

The DIAsource free T4 assay is a one step competitive ELISA system that is rapid and easy to perform compared to equilibrium dialysis and ultrafiltration methods, which are cumbersome and time-consuming. This system employs a highly specific monoclonal antibody and a non-analog tracer that was proved experimentally to have no significant binding to TBG and albumin.

In the euthyroid, normal population the free T4 concentration is 7 – 22 pg/ml. The level of free T4 is decreased in hypothyroidism while in thyrotoxic patients the level of free T4 is increased.

This assay is used at times with other thyroid tests for *in vitro* diagnostic purposes and for assessing patients who are receiving thyroid treatments (follow-up).

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibration curve must be established for every run.
7. The control should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.

12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of fT4 in human serum. The kit is not calibrated for the determination of fT4 in other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Samples reading higher than 100 pg/ml should be reported as such and should not be diluted. Dilution will alter the existing equilibrium and may lead to false results.
5. The interpretation of free T4 results can be complicated by a variety of drugs, severe nonthyroidal illness and some rare conditions such as familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH). For diagnostic purposes, the results of this assay should always be used in combination with the clinical examination, medical history and other findings.
6. Some individuals may have antibodies to mouse protein that can possibly interfere in this assay. Therefore, the results from any patients who have received preparation of mouse antibodies for diagnosis or therapy should be interpreted with caution.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and control has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SERUM PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 25, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. A 37°C incubator
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 11).

REAGENTS PROVIDED

 **Mouse Anti-fT4 Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells**
- Ready To Use.

Contents: One 96 well (12x8) monoclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Ag	HRP	CONC	ft4-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate - X50

Contents: ft4-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 300 µl/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12ml of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL	N	ft4 Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 4
-----	---	---

Contents: Five vials containing ft4 in a human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of T4.

*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume
Calibrator 0	0 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 1	2 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 2	9 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 3	29 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 4	95 pg/ml	0.5 ml

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL	Control - Ready To Use.
---------	--------------------------------

Contents: One vial containing ft4 in a human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of T4. Refer to vial label for expected value and acceptable range.

Volume: 0.5 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8 °C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the control should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH	SOLN	CONC	Wash Buffer Concentrate - X10
------	------	------	--------------------------------------

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

ASS	BUF	Assay Buffer - Ready To Use.
-----	-----	-------------------------------------

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

CHROM	TMB	TMB Substrate - Ready To Use.
-------	-----	--------------------------------------

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN	Stopping Solution - Ready To Use.
------	------	--

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the ft4-HRP conjugate and wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 25 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Gently shake the plate for 10 seconds.
6. Incubate the plate at 37°C for 1 hour.
7. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).
8. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
9. Incubate the plate at 37°C for 10-15 minutes (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
10. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 8.
11. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

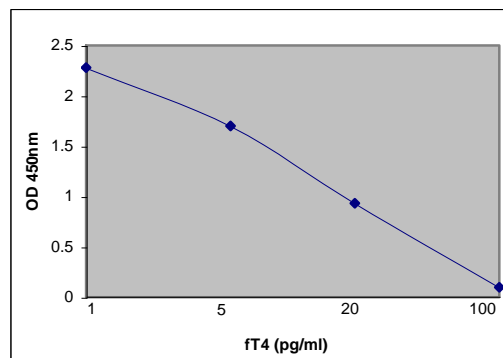
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve

TYPICAL ft4 TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
0	2.427	2.429	2.516	0
1	2.278	2.284	2.281	2
2	1.920	1.888	1.904	9
3	1.120	1.096	1.108	29
4	0.351	0.349	0.350	95

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. Do not use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the calibration curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Calibrator 0 (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the DAsource Direct fT4 ELISA kit is

1.0 pg/ml.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct fT4 ELISA kit with T4 cross-reacting at 100%.

Compound	%Cross Reactivity
L-Thyroxine	100
D-Thyroxine	94
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (Reverse T3)	86
3,3',5'-Triiodo-L-Thyronine (T3)	3.3
3,3',5'-Triiodo-D-Thyronine	1.8
3,3',5'-Triiodothyropropionic acid	0.6

The following compounds were tested but cross-reacted at less than 0.04%: Acetylsalicylic acid, 3,5-Diiodo-L-Thyronine, 3,5-Diiodo-L-Tyrosine and 3-Iodo-L-Tyrosine.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same calibration curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	3.79	0.16	4.8
2	23.26	1.14	4.9
3	70.60	3.04	4.3

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	4.27	0.53	12.3
2	20.54	2.36	11.5
3	67.34	6.67	9.9

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. The following reference range (pg/ml) was established with 80 apparently healthy adults:

Group	N	Range (pg/ml)
Normal Euthyroid Samples	80	7-22

EFFECT OF BILIRUBIN

Bilirubin was added to a patient sample at concentrations of 50 and 100 µg/ml and assayed with the DAsource Direct fT4 ELISA kit. Results are tabulated below:

Sample	fT4 (pg/ml)
Unspiked	8.78
+ 50 µg/ml bilirubin	10.68
+100 µg/ml bilirubin	9.72

No significant effect was observed at these concentrations.

EFFECT OF HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)

Purified human serum albumin (HSA) was added to a patient sample at concentrations of 10, 20 and 40 mg/ml. Samples were assayed with the DAsource Direct fT4 ELISA kit. Results are tabulated below:

Sample	fT4 (pg/ml)
Unspiked	8.78
+10 mg/ml	8.81
+20 mg/ml	9.46
+40 mg/ml	9.90

No binding of labelled fT4 to HSA was found at these concentrations.

EFFECT OF THYROXINE-BINDING GLOBULIN (TBG)

The zero calibrator was spiked precisely with purified TBG at concentrations ranging from 25-200 µg/ml and assayed with the DAsource Direct fT4 ELISA kit. Results are tabulated below:

Sample	TBG Added (µg/ml)	OD 450 nm
1	0	1.883
2	25	2.030
3	50	2.149
4	100	2.175
5	200	2.251

No significant binding of labelled fT4 to TBG was found at these concentrations.

EFFECT OF NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS

Oleic acid was added to a patient sample at concentrations of 0.5, 5 and 20 mmol/L and assayed with the DAsource Direct fT4 ELISA kit. Results are tabulated below:

Sample	fT4 (pg/ml)
Unspiked	24.83
+0.5 mmol/L	20.53
+5 mmol/L	26.06
+20 mmol/L	83.64

At high concentrations of oleic acid, the free T4 level was significantly increased. This is due to the well-known effect that non-esterified fatty acids can dissociate T4 from its carrier proteins.

REFERENCES

1. Ingbar, S.H. et al., J.Clin. Invest, 44:1679, 1965
2. Robins, J., Metabolism, 22(8):1021, 1973
3. Schall, R.F. J., Clin.Chem., 24(10):1801, 1978
4. Selenkow, H.A. and Robin, N.I., J.Maine Med. Assoc., 61:199, 1970
5. Oppenheimer, J.H. et al. J. Clin. Invest., 42:1769, 1963
6. Young, D.S., et al., Clin. Chem., 21:3640, 1975
7. Sterling, K., and Hegedus, A.J. Clin. Invest., 41:1031, 1962
8. Cavalieri, R.R., et al., Clin. Res., 15:124, 1967
9. Comoglio, S. and Celada, F.J., Immunol. Meth., 10:161-170, 1976
10. McComb, R. B., Bowers, G.N., Posen, S., Alkaline Phosphatase, 1st Ed., Chap. 9, pg. 525-704, Plenum Press, New York, 1979

Other translations of this Instructions for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Revision date : 2020-02-24



ft4 Elisa

es

Para la determinación cuantitativa directa de la Tiroxina Libre por inmunoensayo enzimático en suero humano

KAPDB4340

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de la tiroxina libre por inmunoensayo enzimático en suero humano.
Solo para diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio de este inmunoensayo enzimático sigue el formato típico de unión competitiva. La competencia ocurre entre un antígeno no etiquetado (presente en los calibradores, control y muestras de los pacientes) y un antígeno etiquetado con una enzima (conjugado) para un número limitado de sitios de unión del anticuerpo en el pocillo de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantado eliminan el material que no se ha unido. Después del paso de lavado, se añade el sustrato enzimático. La reacción enzimática se detiene añadiendo la solución de parada. Se mide la absorbancia en un lector de placas. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de ft4 en la muestra. Se utiliza un grupo de calibradores para trazar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de ft4 en las muestras de los pacientes y los controles.

La T4 etiquetada (conjugado) utilizado en este ensayo, no ha demostrado tener propiedades de unión hacia la globulina fijadora de la tiroxina (TBG) o la albúmina sérica humana (HSA). Los sitios de unión en los pocillos de la microplaca están diseñados para tener una capacidad de unión baja para no alterar el equilibrio entre T4 y sus proteínas transportadoras. El ensayo se realiza bajo condiciones fisiológicas normales de pH, temperatura y fuerza iónica.

APLICACIONES CLÍNICAS

La Tiroxina (T4), la principal hormona tiroidea, circula en la sangre casi totalmente unida a proteínas transportadoras. Sin embargo, solo la fracción libre (no unida) de la tiroxina se considera como biológicamente activa. Los transportadores principales de la tiroxina son la globulina fijadora de la tiroxina (TBG), la pre albúmina y la albúmina. La medición de los niveles de tiroxina libre (ft4) se correlacionan mejor con el estado clínico que los niveles totales de tiroxina.

El ensayo DIAsource free T4 es un ELISA de un paso, competitivo es rápido y fácil de realizar comparado con la diálisis de equilibrio y el método de ultrafiltración, que son complicados y largos. Este sistema utiliza un anticuerpo monoclonal altamente específico y un trazador no análogo que se ha comprobado experimentalmente que no se une en forma significativa a TBG y a la albúmina.

En la población normal eutiroides la concentración de T4 libre es de 7 – 22 pg/ml. El nivel de T4 libre está disminuido en hipotiroidismo mientras que en pacientes tirotoxicos el nivel de T4 libre está aumentado.

Este ensayo a veces se utiliza con otras pruebas tiroideas para diagnóstico *in vitro* y para evaluar pacientes que están recibiendo tratamiento tiroideo (seguimiento).

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DEL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben conocer en profundidad este protocolo para el uso correcto de este kit. Un rendimiento confiable solo se logrará mediante el cumplimiento estricto y cuidadoso de las instrucciones suministradas.
2. Los materiales de control y las combinaciones de sueros deben incluirse cada vez que se realice un ensayo a nivel alto y bajo para evaluar la confiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifica el uso de agua para dilución o reconstitución, utilizar agua desionizada o destilada.
4. Con el fin de reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deben usar guantes al manipular los reactivos del kit y muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deben estar a temperatura ambiente y se deben mezclar suavemente pero a fondo antes de utilizar. Evitar la congelación y descongelación repetida de los reactivos y muestras.
6. En cada ensayo se debe incluir una curva de calibración.
7. El control se debe incluir en cada ensayo y debe caer entre los límites de confianza establecidos.
8. Es posible que técnicas con procedimientos inadecuados, pipeteo impreciso, lavado incompleto así como la conservación incorrecta de reactivos estén implicados cuando los valores del ensayo para el control no reflejen los rangos establecidos.

9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los pocillos afectará las densidades ópticas (DO). Retirar cuidadosamente todas las burbujas antes de realizar el paso de lectura.

10. La solución de sustrato (TMB) es sensible a la luz y debe permanecer incolora si se conserva adecuadamente. El desarrollo de un color azul puede indicar inestabilidad o contaminación en cuyo caso no se debe utilizar.

11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que el líquido tome contacto con partes metálicas.

12. Para evitar la contaminación de reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desechable para cada reactivo, muestra, calibrador y control.

13. No mezclar diferentes números de lote de componentes del kit, dentro de un ensayo y no utilizar ningún componente después de la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse como desecho peligroso y deben eliminarse según las normativas nacionales

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de ft4 en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de ft4 en otros especímenes de origen humano o animal.

2. No utilizar suero que esté extremadamente hemolizado, lipémico, icterico o haya sido almacenado de forma inadecuada.

3. Todas las muestras o sueros de control que contengan azida no son compatibles con este kit, ya que pueden conducir a resultados falsos.

4. Las muestras cuya lectura esté por sobre 100 pg/ml se deben informar como tales y no deben ser diluidas. La dilución alterará el equilibrio existente y puede conducir a resultados falsos.

5. La interpretación de los resultados de T4 libre se puede complicar debido a una variedad de medicamentos, una enfermedad no tiroidea grave y algunos trastornos como la hipertiroidemia disalbuminémica familiar (FDH). Para diagnosticar, el resultado de este ensayo siempre se debe utilizar en conjunto con el examen clínico, antecedentes médicos y otros hallazgos.

6. Algunos individuos pueden tener anticuerpos a proteínas de ratón que posiblemente pueden interferir en este ensayo. Por lo tanto, los resultados de todos los pacientes que han recibido preparaciones de anticuerpos de ratón para diagnóstico o como tratamiento, se deben interpretar con precaución.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD

MATERIAL QUE PUEDE PRESENTAR UN PELIGRO BIOLÓGICO

El análisis del suero humano que se utilizó en la preparación de los calibradores y los controles resultó negativo para el antígeno de superficie de la hepatitis B y también resultó negativo para los anticuerpos anti VHC y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Sin embargo, ningún método puede garantizar la seguridad total de la ausencia de VIH, VHC y el virus de la hepatitis B o de cualquier otro agente infeccioso. Los reactivos deben considerarse como un peligro biológico potencial y se deben manipular con las mismas precauciones que se aplican a cualquier muestra de sangre.

RIESGO QUÍMICO

Evitar el contacto con reactivos que contienen TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si entra en contacto con cualquiera de estos reactivos, lavar con abundante agua. Se sospecha que TMB es cancerígeno.

TOMA DE MUESTRA Y CONSERVACIÓN

Se necesitan aproximadamente 0,1 ml de suero para una determinación en duplicado. Tomar 4-5 ml de sangre en un tubo correctamente etiquetado y dejarlo coagular. Centrifugar y separar cuidadosamente la capa de suero. Almacenar a 4°C hasta 24 horas o a -10°C o menos si el análisis se realizará más tarde. Considerar todas las muestras humanas como material potencialmente biopeligrosos y tomar las precauciones adecuadas al manipularlas.

TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA

Este ensayo es un sistema directo; no es necesario el tratamiento previo.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

1. Pipetas de precisión para dispensar 25, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Incubadora a 37 °C
5. Lector de microplacas con filtro a 450 nm y un límite superior de DO de 3,0 o más alto* (consultar el paso 11 del procedimiento del ensayo).

REACTIVOS SUMINISTRADOS

TL Pocillos de microplacas desprendibles recubiertos con anticuerpo anti FT4 de ratón – Listo para usar.

Contenido: Una microplaca con 96 pocillos (12x8) recubiertos con anticuerpo monoclonal en una bolsa re sellable con desecante.
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo que se indique en la etiqueta.

Ag HRP CONC Concentrado de conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) – FT4– **50X**

Contenido: Conjugado FT4-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 300 µl/vial
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.
Preparación: Diluir 1:50 en tampón del ensayo antes de utilizar (p. ej. 40 µl de HRP en 2 ml de tampón del ensayo). Si utiliza toda la placa diluir 240 µl de HRP en 12 ml de tampón del ensayo. Eliminar todo lo que sobre.

CAL N Calibradores FT4 – Listos para usar. N = 0 a 4

Contenido: Cinco viales de FT4 e una matriz en base a suero humano con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo una cantidad definida de T4 al suero.
*Las concentraciones aproximadas están en la siguiente tabla, consultar la etiqueta de los viales para obtener las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen
Calibrador 0	0 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 1	2 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 2	9 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 3	29 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 4	95 pg/ml	0,5 ml

Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abiertos los calibradores deben utilizarse dentro de 14 días o alicuotados y conservados congelados. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL Control - Listo para usar.

Contenido: Un vial de FT4 en una matriz en base a suero humano con un conservante sin mercurio. Preparado añadiendo una cantidad definida de T4 a un tampón. Consultar la etiqueta del vial para obtener el valor esperado y rango aceptable.
Volumen: 0,5 ml/vial
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses en viales sellados o según lo indicado en la etiqueta. Una vez abierto se debe utilizar dentro de 14 días o alicuotar y conservar congelado. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

WASH SOLN CONC Tampón de lavado concentrado – **10X**

Contenido: Una botella de tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.
Volumen: 50 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.
Preparación: Diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de utilizar. Si utiliza toda la placa diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

ASS BUF Tampón del ensayo - Listo para usar.

Contenido: Un vial de tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
Volumen: 15 ml/vial
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

CHROM TMB Sustrato TMB – Listo para usar.

Contenido: Una botella de tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno en un tampón sin DMF ni DMSO.
Volumen: 16 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

STOP SOLN Solución de parada - Lista para usar.

Contenido: Un vial de ácido sulfúrico 1M.
Volumen: 6 ml/botella
Conservación: Refrigerar a 2-8°C
Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Tratamiento previo de la muestra: Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarlos. Los calibradores, controles y muestras deben analizarse en duplicado. Una vez que el procedimiento se ha iniciado, todos los pasos se deben completar sin interrupción.

1. Preparar la solución de trabajo del conjugado FT4-HRP y el tampón de lavado.
2. Sacar el número necesario de tiras de microplaca. Volver a sellar la bolsa y devolver las tiras no utilizadas al frigorífico.
3. Pipetear 25 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondientes etiquetados en duplicado.
4. Pipetear 100 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (Recomendamos utilizar una pipeta multicanal).
5. Agitar la placa suavemente por 10 segundos.
6. Incubar la placa a 37°C durante 1 hora.
7. Lavar los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y golpear la placa firmemente sobre un papel absorbente para asegurar que esté seca. (Se recomienda utilizar un lavador automático).
8. Pipetear 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos medidos.
9. Incubar la placa a 37°C durante 10-15 minutos (o hasta que el calibrador 0 adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
10. Pipetear 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos medidos del paso 8.
11. Leer la placa en un lector de microplacas a 450 nm dentro de 20 minutos después de añadir la solución de parada.

* Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si el filtro de 450 nm no está disponible, se puede sustituir por un filtro de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán menores, sin embargo, esto no afectará los resultados de las muestras de control/pacientes.

CÁLCULOS

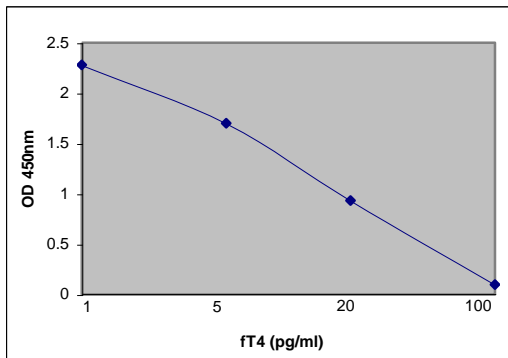
1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Trazar una curva de calibración en papel log-log con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. Si está utilizando software de inmunoensayo, se recomienda utilizar una curva de calibración de 4 parámetros.
3. Calcular la densidad óptica promedio de cada muestra desconocida en duplicado.
4. Leer los valores de las muestras desconocidas directamente de la curva de calibración

TABLA DE DATOS FT4 TÍPICOS

Calibrador	DO 1	DO 2	DO promedio	Valor (pg/ml)
0	2,427	2,429	2,516	0
1	2,278	2,284	2,281	2
2	1,920	1,888	1,904	9
3	1,120	1,096	1,108	29
4	0,351	0,349	0,350	95

CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Curva de ejemplo solamente. No utilizar para calcular resultados.



CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

El límite inferior de detección se calcula a partir de la curva de calibración determinando la concentración resultante de la DO promedio del Calibrador 0 (basado en el análisis de 10 muestras replicadas) menos 2 DE. Por lo tanto, la sensibilidad del kit DAsource Direct ft4 ELISA es **1,0 pg/ml**.

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Los siguientes compuestos se analizaron para reacción cruzada con el kit Direct ft4 ELISA con T4 con reacción cruzada de 100%.

Compuesto	%Reactividad cruzada
L-Tiroxina	100
D-Tiroxina	94
3,3',5'-Triyodo-L-Tironina (T3 reverso)	86
3,3',5'-Triyodo-L-Tironina (T3)	3,3
3,3',5'-Triyodo-D-Tironina	1,8
Acido 3,3',5' Triyodotiropropionico	0,6

Los siguientes compuestos se analizaron pero la reacción cruzada fue menos de 0,04%: ácido acetilsalicílico, 3,5-Diyodo-L-Tironina, 3,5-Diyodo-L-Tirosina y 3-yodo-L-Tirosina.

PRECISIÓN INTRA ENSAYO

Tres muestras se analizaron diez veces cada una en la misma curva de calibración. Los resultados (en pg/ml) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	3,79	0,16	4,8
2	23,26	1,14	4,9
3	70,60	3,04	4,3

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

Tres muestras fueron analizadas diez veces durante un periodo de cuatro semanas. Los resultados (en pg/ml) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	4,27	0,53	12,3
2	20,54	2,36	11,5
3	67,34	6,67	9,9

VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe recolectar sus datos y establecer su propio rango de valores normales esperados. El siguiente rango de referencia (pg/ml) se estableció a partir de 80 adultos aparentemente sanos:

Grupo	N	Rango (pg/ml)
Muestra eutiroides normal	80	7-22

EFFECTO DE LA BILIRRUBINA

Se añadió bilirrubina a la muestra de un paciente a concentraciones de 50 y 100 µg/ml y se analizaron con el kit DAsource Direct ft4 ELISA. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	ft4 (pg/ml)
Sin bilirrubina añadida	8,78
+50 µg/ml bilirrubina	10,68
+100 µg/ml bilirrubina	9,72

No se observó un efecto significativo a estas concentraciones.

EFFECTO DE LA ALBÚMINA SÉRICA HUMANA (HSA)

Se añadió albúmina sérica humana purificada (HSA) a la muestra de suero de un paciente en concentraciones de 10, 20 y 40 mg/ml. Las muestras se analizaron con el kit DAsource Direct ft4 ELISA. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	FT4 (pg/ml)
Sin albúmina añadida	8,78
+10 mg/ml	8,81
+20 mg/ml	9,46
+40 mg/ml	9,90

No se observó unión de ft4 marcado a HSA a estas concentraciones.

EFFECTO DE LA GLOBULINA FIJADORA DE TIROXINA (TBG)

Se añadió TBG purificada al calibrador 0 en forma precisa con TBG purificada en concentraciones entre 25-200 µg/ml y se analizaron con el kit DAsource Direct ft4 ELISA. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	TBG añadido (µg/ml)	DO 450 nm
1	0	1,883
2	25	2,030
3	50	2,149
4	100	2,175
5	200	2,251

No se observó unión significativa de ft4 marcado a TBG a estas concentraciones.

EFFECTO DE ÁCIDOS GRASOS NO ESTERIFICADOS

Se añadió ácido oleico a la muestra de un paciente en concentraciones de 0,5, 5 y 20 mmol/l y se analizaron con el kit DAsource Direct ft4 ELISA. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	ft4 (pg/ml)
Sin ácido oleico añadido	24,83
+0,5 mmol/l	20,53
+5 mmol/l	26,06
+20 mmol/l	83,64

A concentraciones altas de ácido oleico, el nivel de T4 libre aumentó significativamente. Esto se debe al conocido efecto de que los ácidos grasos no esterificados pueden disociar T4 de sus proteínas transportadoras.

REFERENCIAS

1. Ingbar, S.H. et al., J.Clin. Invest., 44:1679, 1965
2. Robins, J., Metabolism, 22(8):1021, 1973
3. Schall, R.F. J., Clin.Chem., 24(10):1801, 1978
4. Selenkow, H.A. and Robin, N.I., J. Maine Med. Assoc., 61:199, 1970
5. Oppenheimer, J.H. et al. J. Clin. Invest., 42:1769, 1963
6. Young, D.S., et al., Clin. Chem., 21:3640, 1975
7. Sterling, K., and Hegedus, A.J. Clin. Invest., 41:1031, 1962
8. Cavalieri, R.R., et al., Clin. Res., 15:124, 1967
9. Comoglio, S. and Celada, F.J., Immunol. Meth., 10:161-170, 1976
10. McComb, R. B., Bowers, G.N., Posen, S., Alkaline Phosphatase, 1st Ed., Chap. 9, pg. 525-704, Plenum Press, New York, 1979

Fecha de revisión : 2020-02-24