



T4 Elisa

KAPDB4240



DIAsource ImmunoAssays S.A. - Rue du Bosquet, 2 - B-1348 Louvain-la-Neuve - Belgium

Version: 230629

History

Summary of change :

Previous Version :	Current Version :
200224/1	230629
One control provided	Two controls provided
Old Diasource logo	New DiaSource logo on the front page



T4 Elisa

en

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

KAPDB4240 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 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 T4 in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of T4 in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Clinical Trends:

- The level of T4 in hypothyroid patients is decreased.
- The level of T4 in hyperthyroid patients is increased.
- In euthyroid individuals the level of T4 is within the normal range.

Thyroid binding globulin (TBG) levels have reportedly been elevated by the following conditions: increased estrogens from oral contraceptives, androgens, glucocorticoids and pregnancy. Consequently, borderline T4 values should be viewed with caution when any of the above conditions are present.

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. The assay buffer is sensitive to light and should be stored in the original dark bottle away from direct sunlight.
12. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
13. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
14. 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.
15. 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 T4 in human serum. The kit is not calibrated for the determination of T4 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 or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.

4. Only calibrator 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.

5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

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 as 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 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED

Mouse Anti-T4 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
----	-----	------

T4-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate -

Contents: T4-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 1 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:25 in assay buffer before use (eg. 80 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 800 µl of HRP in 20 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

CAL N

T4 Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 4

Contents: Five vials containing T4 in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer 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 µg/dl	2.0 ml
Calibrator 1	1 µg/dl	0.5 ml
Calibrator 2	4 µg/dl	0.5 ml
Calibrator 3	12 µg/dl	0.5 ml
Calibrator 4	32 µg/dl	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

Controls - Ready To Use.

Contents: Two vials containing T4 in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer 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 controls 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 BUFS

Assay Buffer - Ready To Use.

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

Volume: 25 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 T4-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 20 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 150 µl of the conjugate working solution into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 30 minutes at room temperature.
6. 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).
7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate on a plate shaker for 15-20 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. 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

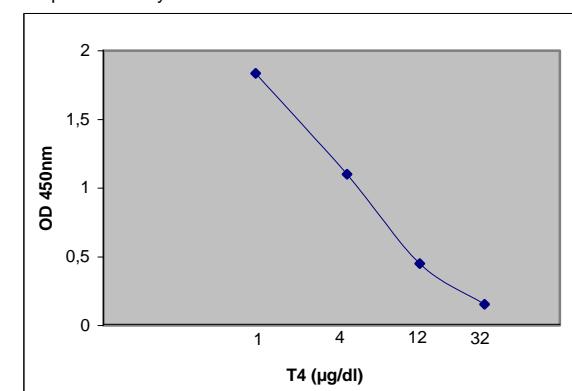
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve.
5. If a sample reads more than 32 µg/dl then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (µg/dl)
0	2.176	2.174	2.175	0
1	1.850	1.820	1.835	1
2	1.092	1.109	1.101	4
3	0.434	0.468	0.451	12
4	0.152	0.158	0.155	32
Unknown	0.635	0.634	0.635	8.3

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 DiaSource Direct T4 ELISA kit is **0.6 µg/dl**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct T4 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 µg/dl) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	2.48	0.23	9.2
2	8.58	0.60	6.9
3	20.46	1.33	6.4

INTER-ASSAY PRECISION

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

Sample	Mean	SD	CV%
1	3.33	0.41	12.3
2	10.30	1.19	11.5
3	14.5	1.44	9.9

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of T4 to three patient serum samples. The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	2.03	-	-
+2.91	4.64	4.94	93.9
+7.38	9.28	9.41	98.6
+13.70	17.93	15.73	114.0
2 Unspiked	9.43	-	-
+2.91	13.17	12.32	106.9
+7.38	19.56	16.81	116.4
+13.70	25.81	23.13	111.6
3 Unspiked	24.03	-	-
+2.91	26.74	26.94	99.3
+7.38	30.65	31.41	97.6
+13.70	>32	37.73	-

LINEARITY

Two patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in µg/dl) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	22.50	-	-
1:2	11.74	11.25	104.4
1:4	5.70	5.63	101.2
1:8	2.71	2.81	96.4
2	25.64	-	-
1:2	14.50	12.82	113.1
1:4	6.90	6.41	107.6
1:8	3.31	3.21	103.1

EXPECTED VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (µg/dl)
Euthyroid	4-12
Hyperthyroid	>12
Hypothyroid	<4

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 : 2023-06-29



T4 Elisa

es

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

KAPDB4240

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

USO PREVISTO

Para la determinación cuantitativa directa de la tiroxina 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 T4 en la muestra. Se utiliza un grupo de calibradores para trazar una curva de calibración desde donde se puede leer directamente la cantidad de T4 en las muestras de los pacientes y los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

Tendencias clínicas:

- El nivel de T4 en pacientes hipotiroides está disminuido.
- El nivel de T4 en pacientes hipertiroides está aumentado.
- En individuos eutiroideos el nivel de T4 está dentro del rango normal.

Los niveles de la globulina fijadora tiroidea (TBG), según se informa, aumentan con anticonceptivos orales, andrógenos, glucocorticoides y embarazo. Por lo tanto los valores límitrofes de T4, deben considerarse con precaución cuando alguna de las condiciones anteriores esté presente.

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. El tampón del ensayo es sensible a la luz y se debe conservar en la botella oscura original lejos de la luz directa del sol.
12. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no utilizar pipetas en las que el líquido tome contacto con partes metálicas.
13. Para evitar la contaminación de reactivos, utilizar una punta de pipeta nueva desecharable para cada reactivo, muestra, calibrador y control.
14. 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.
15. 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 T4 en suero humano. El kit no está calibrado para la determinación de T4 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 o timerosal no son compatibles con este kit, ya que pueden conducir a resultados falsos.
4. Solo se puede utilizar el calibrador 0 para diluir muestras con suero elevado. La utilización de cualquier otro reactivo puede conducir a resultados falsos.
5. Nunca se deben utilizar los resultados obtenidos con este kit como única base para un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la ocurrencia de anticuerpos heterófilicos en pacientes que regularmente están expuestos a animales o productos animales, potencialmente puede causar interferencias en pruebas inmunológicas. Por lo tanto, el diagnóstico clínico debe incluir todos los aspectos de los antecedentes de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales/productos si se sospecha un resultado falso.

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 biopeligroso 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 que dispensen 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipetas desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de placas
5. Lector de microplacas con filtro a 450 nm y un límite superior de DO de 3,0 o más alto* (consultar el paso 10 del procedimiento del ensayo).

REACTIVOS SUMINISTRADOS

Pocillos de microplaca desprendibles recubiertos con anti T4 de ratón – Listos para usar.

Contenido: Una microplaca de 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 indicado en la etiqueta.

AG	HRP	CONC
----	-----	------

Concentrado del conjugado de peroxidasa de rábano picante (HRP) – T4 25X

Contenido: Conjugado T4-HRP en un tampón en base proteica con un conservante sin plomo.

Volumen: 1 ml/vial

Conservación: Refrigerar a 2-8°C

Estabilidad: 12 meses o según lo indicado en la etiqueta.

Preparación: Diluir 1:25 en tampón del ensayo antes de utilizar (p. ej. 80 µl de HRP en 2 ml de tampón del ensayo). Si utiliza toda la placa diluir 800 µl de HRP en 20 ml de tampón del ensayo. Eliminar todo lo que sobre.

CAL	N
-----	---

Calibradores T4 – Listos para usar. N = 0 a 4

Contenido: Cinco viales de T4 en un tampón en base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo una cantidad definida de T4 a un tampón.

*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 µg/dl	2,0 ml
Calibrador 1	1 µg/dl	0,5 ml
Calibrador 2	4 µg/dl	0,5 ml
Calibrador 3	12 µg/dl	0,5 ml
Calibrador 4	32 µg/dl	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 aliquotados y conservados congelados. Evitar múltiples ciclos de congelación y descongelación.

CONTROL

Controles - Listo para usar.

Contenido: Dos viales de T4 en un tampón en base proteica 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 aliquotado y conservado 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.**Tampón del ensayo** – Listo para usar.

Contenido: Un vial de tampón en base proteica con un conservante sin mercurio.

Volumen: 25 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 utilizar. 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 el conjugado HRP- anti T4 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 20 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos correspondientes etiquetados en duplicado.
 4. Pipetear 150 µl de la solución de trabajo del conjugado en cada pocillo (Recomendamos utilizar una pipeta multicanal).
 5. Incubar en un agitador de placas (aproximadamente 200 rpm) durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 6. 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).
 7. Pipetear 150 µl de sustrato TMB en cada pocillo a intervalos medidos.
 8. Incubar en un agitador de placas durante 15-20 a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador O adquiera un color azul oscuro para la DO deseada).
 9. Pipetear 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos medidos del paso 7.
 10. 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

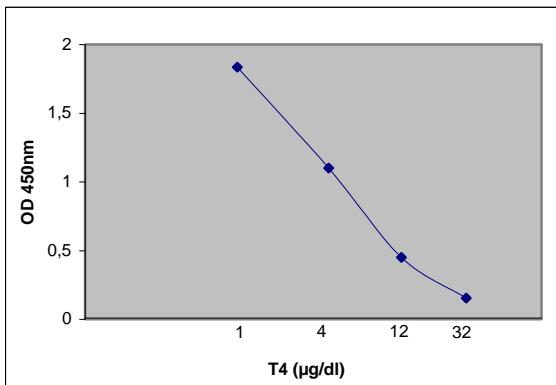
1. Calcular la densidad óptica promedio de cada calibrador en duplicado.
2. Trazar una curva de calibración en papel de gráfico semi logarítmico con las densidades ópticas promedio en el eje Y y las concentraciones del calibrador en el eje X. Si está utilizando software de inmunoensayo, se recomienda 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.
5. Si la lectura de una muestra es mayor de 32 µg/dl diluir con el calibrador 0 a una dilución no mayor de 1:8. El resultado obtenido se debe multiplicar por el factor de dilución.

TABLA DE DATOS TÍPICOS

Calibrador	DO 1	DO 2	DO Promedio	Valor (µg/dl)
0	2,176	2,174	2,175	0
1	1,850	1,820	1,835	1
2	1,092	1,109	1,101	4
3	0,434	0,468	0,451	12
4	0,152	0,158	0,155	32
Desconocido	0,635	0,634	0,635	8,3

CURVA DE CALIBRACIÓN TÍPICA

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 DiAsource Direct T4 ELISA es **0,6 µg/dl**.

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Los siguientes compuestos se analizaron para reactividad cruzada con el kit Direct T4 ELISA con T4 con reacción cruzada del 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
Ácido 3,3',5'-Triyodotripropionico	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 µg/dl) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	2,48	0,23	9,2
2	8,58	0,60	6,9
3	20,46	1,33	6,4

PRECISIÓN ENTRE ENSAYOS

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

Muestra	Promedio	DE	CV%
1	3,33	0,41	12,3
2	10,30	1,19	11,5
3	14,5	1,44	9,9

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras añadiéndoles cantidades definidas de T4 a tres muestras de suero de pacientes. Los resultados (en µg/dl) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%
1 Sin T4 añadido	2,03	-	-
+2,91	4,64	4,94	93,9
+7,38	9,28	9,41	98,6
+13,70	17,93	15,73	114,0
2 Sin T4	9,43	-	-
+2,91	13,17	12,32	106,9
+7,38	19,56	16,81	116,4
+13,70	25,81	23,13	111,6
3 Sin T4 +2,91	24,03	-	-
+7,38	26,74	26,94	99,3
+13,70	30,65	31,41	97,6
>32	37,73	37,73	-

LINEALIDAD

Dos sueros de pacientes se diluyeron con el calibrador 0. Los resultados (en µg/dl) se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	Resultados observados	Resultados esperados	Recuperación%
1	22,50	-	-
1:2	11,74	11,25	104,4
1:4	5,70	5,63	101,2
1:8	2,71	2,81	96,4
2	25,64	-	-
1:2	14,50	12,82	113,1
1:4	6,90	6,41	107,6
1:8	3,31	3,21	103,1

VALORES ESPERADOS

Como en todos los ensayos clínicos, cada laboratorio debe recolectar sus datos y establecer su propio rango de valores normales esperados.

Grupo	Rango (µg/dl)
Eutiroideo	4-12
Hipertiroideo	>12
Hipotiroido	<4

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: 2023-06-29