



DCM038-12
Ed. 02/2024

FT4 ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della tiroxina libera (FT4) nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere etichetta esterna

2°C  8°C

Σ  $\Sigma = 96$ test

REF DKO038

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di tiroxina libera (FT4) nel siero o plasma umano da una popolazione adulta.

Il kit FT4 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone tiroideo, tiroxina (T4), è prodotto dalla ghiandola tiroide. Un componente importante nella sintesi è lo iodio. Il principale ormone tiroideo presente nel sangue è la tiroxina (T4). La tiroxina è convertita in T3 attivo (tre - quattro volte più potente di T4) all'interno delle cellule dalle deiodinasi (5'-iodinasi).

La Tiroxine-binding globulin (TGB) è la proteina carrier per l'ormone tiroideo circolante. Soltanto una frazione molto piccola dell'ormone T4 è libera (FT4, 0,03%). Quando l'ormone tiroideo è legato, non è attivo, il rapporto FT3/FT4 è molto importante. Per questo motivo, la misura del T4 totale nel sangue può essere impreciso.

La concentrazione degli ormoni tiroidei liberi nel sangue è regolata da un meccanismo feedback negativo, che coinvolge il TSH. Il legame di T4 da parte di TBG svolge un ruolo chiave in questo meccanismo ed i cambiamenti più significativi della capacità di legare il T4 sono il risultato di alterazioni in TBG. Le variazioni nei livelli circolanti di TBG provocheranno un aumento o una diminuzione proporzionale nella concentrazione di T4 totale. Tuttavia, la misura del FT4 nel siero, non è vincolata dai cambiamenti nei livelli della proteina T4 e quindi correla bene con la funzione tiroidea. I fattori responsabili delle discrepanze fra i livelli di T4 totale nel siero e la funzionalità tiroidea, sono la concentrazione di TBG, gli ormoni estrogenici (gravidanza, anticoncezionali orali ed estrogeni) e i farmaci che si legano al TBG impedendone il relativo legame con T4.

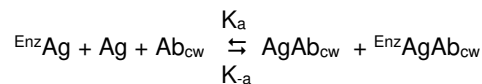
Gli ormoni tiroidei agiscono sull'organismo in modo da aumentare il metabolismo basale, interessano la sintesi proteica ed aumentano la sensibilità del corpo alle catecolammine (quali l'adrenalina). Gli ormoni tiroidei sono essenziali per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule del corpo umano. Questi ormoni inoltre regolano il metabolismo delle proteine, dei grassi e dei carboidrati, sono coinvolte nella regolazione del uso dei residui energetici da parte delle cellule. Stimoli fisiologici e patologici influenzano la sintesi dell'ormone tiroideo. La tirotossicosi o ipertiroidismo, è la sindrome clinica causata da un eccesso di T3 circolante.

Sia il T3 che il T4 sono usati nella terapia per l'ipotiroidismo.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il T4 libero (FT4, antigene) presente nel campione, compete con il T4 antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-T4 adsorbito su micropiastra (fase solida)

L'interazione è illustrata dalla equazione seguente:



Ab_{cw}: anticorpo monospecifico immobilizzato (quantità costante)

Ag: antigene nativo (quantità variabile)

EnzAg: antigene coniugato a enzima HRP (quantità costante)

Ag Ab_{cw}: complesso antigene-anticorpo

EnzAgAb_{cw}: complesso antigene-anticorpo-enzima HRP

K_a: costante di associazione

K_{-a}: costante di dissociazione

K = k_a / k_{-a}: costante di equilibrio

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di FT4 presente nel campione.

La concentrazione di FT4 nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0

CAL1

CAL2

CAL3

CAL4

CAL5

REF DCE002/3806-0

REF DCE002/3807-0

REF DCE002/3808-0

REF DCE002/3809-0

REF DCE002/3810-0

REF DCE002/3811-0

2. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

T4 coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)

(proteggere dalla luce solare)

REF DCE002/3802-0

3. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)
Anticorpo anti T4 adsorbito su micropiastre
REF DCE002/3803-0
4. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) *(evitare il contatto con la pelle)*
ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**
5. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L *(evitare il contatto con la pelle)*
REF DCE005-0
6. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L, ProClin >0,0015%
REF DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

Note

*Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.
Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.*

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su Esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
-  Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (wash solution) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Contiene: ProClin 300

Attenzione

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.
P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).
P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- La concentrazione della Tiroxina totale nel siero dipende da molteplici fattori: dalla funzionalità della ghiandola tiroidea e dalla sua regolazione, tiroxina binding globulin (TBG), e dal legame della tiroxina alla TBG. Tuttavia, la concentrazione della tiroxina totale non è sufficiente da sola a monitorare lo stato clinico. I valori della tiroxina totale nel siero possono aumentare in gravidanza o per somministrazione di contraccettivi orali. La tabella dei farmaci interferenti e le condizioni nella quali i valori di tiroxina totale sono influenzati, sono stati compilati dal Journal of the American Association of Clinical Chemists.
- Non usare per lo screening dei neonati

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.

- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, itterici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione degli Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro "Human Serum Reference" di FT4, e hanno concentrazioni approssimative di:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/dL	0	0,3	0,95	2,1	3,6	7,0

La concentrazione dei Calibratori è lotto-specifica; i valori esatti sono riportati nelle etichette e nel Certificato di Analisi per ogni specifico lotto.

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Coniugato (reattivo 2)

Esposizioni prolungate del Coniugato alla luce solare possono influenzare le caratteristiche funzionali del dosaggio; pertanto non esporre il Coniugato a luce solare diretta.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.4. Preparazione del campione

La determinazione dell'FT4 si effettua su siero o plasma umano. I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 48 ore.

Se non può essere testato entro le 48 ore, conservare il campione a -20°C fino a 30 giorni. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Se testato in duplicato sono necessari 0,100 mL di campione.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Calibratori C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione /Controllo		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Agitare gentilmente la micropiastre per 20-30 secondi e coprirle. Incubare 1h a temperatura ambiente (22÷28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto; lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastre capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare a temperatura ambiente (22÷28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Mescolare gentilmente per 15-20 secondi. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli di ipotiroidie, eutiroidie e ipertiroidie per monitorare la performance del kit. Questi controlli devono essere trattati come sconosciuti e i valori determinati in ogni seduta.

I fogli di controllo qualità dovrebbero essere mantenuti per seguire le performance dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare il trend. Ogni laboratorio dovrebbe scegliere i limiti di accettabilità delle performance del kit. Altri parametri da monitorare includono le intercette 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità inter-assay. Inoltre, l'assorbanza massima dovrebbe rispecchiare i valori delle sedute precedenti. Deviazioni significative dalle performance stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Usare reagenti freschi per determinare le ragioni delle variazioni.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico delle assorbanze (Em) di ciascun Calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in ng/dL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Uno studio di popolazione adulta eutiroide è stato utilizzato per determinare i valori attesi per l'FT4 ELISA kit.

	Media (ng/dL)	SD	Range (ng/dL)
Adulti	1,4	0,6	0,8 – 2,0
Gravidanza	1,5	0,7	0,8 – 2,2

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è ≤ 10,98%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 10,81%.

10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di FT4 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,05 ng/dL con un limite di confidenza del 95%.

10.3. Specificità

La cross-reattività dell'anti-tiroxina verso determinate sostanze è stata determinata aggiungendo le soluzioni interferenti a una matrice di siero a varie concentrazioni. La cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra la concentrazione di sostanze interferenti e la concentrazione di Tiroxina necessaria per spiazzare la stessa quantità di coniugato:

Sostanza	Cross-reattività	Concentrazione
I -Thyroxine	1,0000	---
d -Thyroxine	0,9800	10 µg/dL
I-Triiodo-thyronine	0,0300	100 µg/dL
d-Triiodo-thyronine	0,0150	100 µg/dL
Monoiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Diiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Triiodothyroacetic Acid	N/D	100 µg/mL
Tetraiodothyroacetic Acid	0,0001	100 µg/mL

10.4. Correlazione contro riferimento RIA

Il kit Dia.Metra FT4 ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 197 campioni di siero. La curva di regressione è:

(FT4 RIA) = 0,952*(FT4 Dia.Metra) + 0,103

r² = 0,920

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

BIBLIOGRAFIA

- 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. 02/2024

DCM038-12



DCM038-12
Ed. 02/2024

FT4 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of free thyroxine (FT4) in human serum or plasma.

IVD

LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO038

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free thyroxine (FT4) concentration in human serum or plasma from an adult population.

FT4 ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The thyroid hormone, thyroxine (T4) is produced by the thyroid gland. An important component in the synthesis is iodine. The major form of thyroid hormone in the blood is thyroxine (T4). Thyroxine is converted to the active T3 (three to four times more potent than T4) within cells by deiodinases (5'-iodinase).

Thyroxine-binding globulin (TGB) is the major carrier protein for circulating thyroid hormone. Only a very small fraction of the circulating hormone is free (unbound) - T4 0.03%. When thyroid hormone is bound, it is not active, so the amount of FT3/FT4 is what is important. For this reason, measuring total thyroxine in the blood can be misleading.

The concentration of free thyroid hormones in the blood is regulated by a negative feedback mechanism involving TSH. The binding of T4 by TBG plays a key role in this feedback mechanism and the most significant changes that occur in T4 binding capacity are the result of alterations in TBG. Changes in the circulating levels of TBG will result in a proportional increase or decrease in the concentration of total T4. However, measurement of serum FT4 is unaffected by changes in T4 protein binding levels and therefore correlates well with the functional thyroid state in most individuals. Factors responsible for discrepancies between serum total T4 levels and true thyroid states include TBG concentration, estrogenic hormones (pregnancy, oral contraceptives and estrogen) and drugs that bind to TBG preventing its binding to FT4

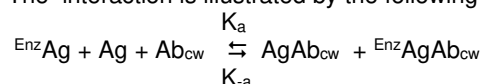
The thyronines act on the body to increase the basal metabolic rate, affect protein synthesis and increase the body's sensitivity to catecholamines (such as adrenaline) by permissiveness. The thyroid hormones are essential to proper development and differentiation of all cells of the human body. These hormones also regulate protein, fat, and carbohydrate metabolism, affecting how human cells use energetic compounds. Numerous physiological and pathological stimuli influence thyroid hormone synthesis. Thyrotoxicosis or hyperthyroidism is the clinical syndrome caused by an excess of circulating free thyroxine, free triiodothyronine, or both. Both T3 and T4 are used to treat thyroid hormone deficiency (hypothyroidism).

2. PRINCIPLE

The free T4 (FT4, antigen) in the sample competes with the antigenic T4 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

for binding to the limited number of antibodies anti T4 coated on the microplate (solid phase)

The interaction is illustrated by the following equation:



Ab_{cw}: monospecific immobilised antibody (constant quantity)

Ag: native antigen (variable quantity)

EnzAg: antigen conjugated to enzyme HRP (constant quantity)

AgAb_{cw}: antigen-antibody complex

EnzAgAb_{cw}: antigen-HRP-antibody complex

K_a: rate constant of association

K_{-a}: rate constant of disassociation

K = k_a / k_{-a}: equilibrium constant

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the FT4 concentration of in the sample.

FT4 concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/3806-0
CAL1	REF DCE002/3807-0
CAL2	REF DCE002/3808-0
CAL3	REF DCE002/3809-0
CAL4	REF DCE002/3810-0
CAL5	REF DCE002/3811-0

2. Conjugate (1 vial, 12 mL)

T4 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (keep away from sunlight) REF DCE002/3802-0

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti T4 antibody adsorbed on microplate REF DCE002/3803-0

4. **TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)
 ProClin <0.0015% **REF DCE004-0**
5. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
 Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
6. **50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)
 NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L, ProClin >0.0015%
REF DCE006-0

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents (wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Skin sensitivity, Category 1



Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust / fume / gas / mist / vapours / spray.

P280 - Wear protective gloves/ protective clothing / eye protection / face protection / hearing protection.

P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).

P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.

P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/ H_2O_2 to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- Total serum thyroxine concentration is dependent upon a multiplicity of factors: thyroid gland function and its regulation, thyroxine binding globulin (TBG) concentration, and the binding of thyroxine to TBG. Thus, total thyroxine concentration alone is not sufficient to assess clinical status. Total serum thyroxine values may be elevated under conditions such as pregnancy or administration of oral contraceptives. A T3 uptake test may be performed to estimate the relative TBG concentration in order to determine if the elevated T4 is caused by TBG variation.
- A table of interfering drugs and conditions, which affect total thyroxine values, has been compiled by the Journal of the American Association of Clinical Chemists.
- Not intended for newborn screening.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against Human Serum Reference for free thyroxine and have approximate concentrations of:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
ng/dL	0	0.3	0.95	2.1	3.6	7.0

Calibrators concentration is lot-specific; the exact values are stated on labels and Certificate of Analysis for each lot.

The Calibrators are stable until the expiry date stated on the label. Once opened, they are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Conjugate (reagent 2)

Prolonged exposure of the Conjugate to sunlight may affect the functional characteristics of the assay; therefore do not expose the Conjugate to direct sunlight.

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

6.4. Preparation of the Sample

The determination of FT4 should be performed in human serum or plasma.

Specimens may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 48 hours. If the specimens cannot be assayed within 48 hours, the samples may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

When assayed in duplicate, 0,100 mL of the specimen are required.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample/Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix and cover it. Incubate 1 h at room temperature (22÷28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake gently the microplate for 15-20 seconds. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E_m) of the Calibrators (C_0 - C_5) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in ng/dL.

9. REFERENCE VALUES

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for the FT4 ELISA test. The mean values, Calibrator deviations and expected ranges are:

	Mean (ng/dL)	SD	Range (ng/dL)
Adult	1,4	0,6	0,8 – 2,0
Pregnancy	1,5	0,7	0,8 – 2,2

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 10.98\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is $\leq 10.81\%$.

10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of FT4 that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.05 ng/dL at the 95% confidence limit.

10.3. Specificity

The cross-reactivity of the Thyroxine antibody to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between doses of interfering substance to dose of Thyroxine needed to displace the same amount of tracer:

Substance	Cross-reactivity	Concentration
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. Correlation with RIA

Dia.Metra FT4 ELISA was compared with a coated tube radioimmunoassay method. The total number of specimens was 197. The linear regression curve was calculated:

$$(\text{FT4 RIA}) = 0.952 * (\text{FT4 Dia.Metra}) + 0.103$$

$$r^2 = 0.920$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- 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. 02/2024

DCM038-12



DCM038-12
Ed. 02/2024

FT4 ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de tiroxina libre (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 tiroxina libre (FT4) en suero o plasma humano de una población adulta.

El kit FT4 ELISA 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 está 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

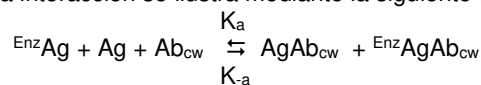
hormona tiroidea. Un exceso de T3 circulante causa el síndrome clínico de tirotoxicosis o hipertiroidismo.

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

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La T4 libre (FT4, antígeno) presente en la muestra compete con la T4 antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-T4 absorbido en la microplaca (fase sólida).

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



Ab_{cw}: anticuerpo monoespecífico inmovilizado (cantidad constante)

Ag: antígeno nativo (cantidad variable)

EnzAg: antígeno conjugado con enzima HRP (cantidad constante)

Ag Ab_{cw}: complejo antígeno-anticuerpo

Enz Ag Ab_{cw}: complejo antígeno-HRP-anticuerpo

K_a: constante de asociación

K_{-a}: constante de disociación

K = k_a / k_{-a}: constante de equilibrio

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por ultimo, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el Substrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de FT4 presente en la muestra.

La concentración de FT4 en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/3806-0
CAL1	REF	DCE002/3807-0
CAL2	REF	DCE002/3808-0
CAL3	REF	DCE002/3809-0
CAL4	REF	DCE002/3810-0
CAL5	REF	DCE002/3811-0

2. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

T4 conjugada con peroxidasa de rabano (HRP)

(Mantener alejado de la luz solar)

REF DCE002/3802-0

3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti-T4 absorbido en la microplaca

REF DCE002/3803-0

4. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel).

ProClin <0,0015% REF DCE004-0

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

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

REF DCE005-0

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

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L. ProClin >0,0015%

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, 620-630 nm)

Nota

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

Abrir la bolsa del reactivo 3 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
-  Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, 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 Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos (solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008

[CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- 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/H₂O₂ 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 tiroidea y de su regulación, de la globulina que transporta la tiroxina (TGB), y de la unión de la tiroxina a la TGB. 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 marcadas.
- 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 el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente validado para su uso previsto.
- 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

mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.

- 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, ictericas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al "Human Serum Reference" (referencias de suero humano) de tiroxina libre, y tienen las siguientes concentraciones aproximadas:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
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.

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Conjugado

La exposición prolongada del Conjugado a la luz solar puede afectar las características funcionales de la prueba, por lo tanto no exponga el Conjugado a la luz solar directa.

6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 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.

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de FT4 se realiza en suero o plasma humano.

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. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,100 mL de la muestra.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	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. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
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 una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.			

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 de calibración 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.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E_m) en función de las concentraciones de los Calibradores (C_0 - C_5).

Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. 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 ELISA 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

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

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 que puede distinguirse del Calibrador 0 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 µg/dL
I-Triiodo-thyronine	0,0300	100 µg/dL
d-Triiodo-thyronine	0,0150	100 µg/dL
Monoiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Diiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Triiodothyroacetic Acid	N/D	100 µg/mL
Tetraiodothyroacetic Acid	0,0001	100 µg/mL

10.4. Correlación con referencia RIA

El kit Dia.Metra FT4 ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 197 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$(FT4 \text{ RIA}) = 0,952 \cdot (FT4 \text{ Dia.Metra}) + 0,103$$

$$r^2 = 0,920$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

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. 02/2024

DCM038-12

	DE <i>In vitro</i> Diagnostikum ES Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> FR Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> EN <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device IT Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> PT Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE Hergestellt von ES Elaborado por FR Fabriqué par EN Manufacturer IT Produttore PT Produzido por
	DE Achtung, Begleitdokumente ES Precaución, consulte los documentos adjuntos FR Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement EN Caution, consult accompanying documents IT Attenzione, consultare la documentazione allegata PT Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE Herstellungs datum ES Fecha de fabricacion FR Date de fabrication EN Date of manufacture IT Data di produzione PT Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE Verwendbar bis ES Estable hasta (usar antes de último día del mes) FR Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) EN 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 Riesco biológico FR Risque biologique EN Biological risk IT Rischio biologico PT Risco biológico
	DE Gebrauchsanweisung beachten ES Consultar las instrucciones FR Consulter le mode d'emploi EN Consult instructions for use IT Consultare le istruzioni per l'uso PT Consultar instruções para uso		DE Chargenbezeichnung ES Código de lote FR Numero de lot EN Batch code IT Codice del lotto PT Código do lote
 $\Sigma = xx$	DE Ausreichend für "n" Tests ES Contenido suficiente para "n" tests FR Contenu suffisant pour "n" tests EN Contains sufficient for "n" tests IT Contenuto sufficiente per "n" saggi PT Contém o suficiente para "n" testes		DE Inhalt ES Contenido del estuche FR Contenu du coffret EN Contents of kit IT Contenuto del kit PT Conteúdo do kit
 Max Min	DE Temperaturbereich ES Limitación de temperatura FR Limites de température de conservation EN Temperature limitation IT Limiti di temperatura PT Temperaturas limites de conservação		DE Bestellnummer ES Número de catálogo FR Références du catalogue EN Catalogue number IT Numero di Catalogo PT Número do catálogo
	DE Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen ES Mantener alejado de la luz solar FR Tenir à l'écart de la lumière du soleil EN Keep away from sunlight IT Tenere lontano dalla luce solare PT Mantenha longe da luz solar		