

Inserto Tiroxina Libre (T4 Libre) - ELISA

MONOBIND, INC.

Código de Producto: 1225-300

Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de Tiroxina Libre en suero humano o plasma por un inmuno-ensayo de enzima en microplaca.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

Tiroxina, la hormona tiroidea principal, circula en la sangre casi completamente atada acarreado proteínas. El sostén principal es la globulina tiroxina-atada (TBG). De cualquier manera, solo la porción libre (desatada) de tiroxina es responsable de la acción biológica. Mas adelante, las concentraciones de las proteínas de sostén están alteradas en condiciones clínicas variables, tales como el embarazo. En funciones tiroideas normales como las concentraciones de las proteínas alteradas, acarreadas, el nivel de tiroxina total cambian para que las concentraciones de tiroxina libre se mantengan constantes. Así, las mediciones de concentraciones de tiroxina libre correlaciones mejor con el status clínico que los niveles de tiroxina total.

El incremento de tiroxina total asociada con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos ocasionalmente resulta en niveles de T4 total sobre los límites de lo normal del rango de referencia. Enmascarando la función tiroidea anormal puede ocurrir también tanto en condiciones de hiper o hipotiroidismo por alteraciones en la concentración de TBG. El T4 Total puede elevarse o disminuir por los cambios de TBG tales como el resultado de los niveles normales de referencia. La concentración de tiroxina libre puede ayudar a descubrir el status clínico actual del paciente.

En este método, la referencia del suero, el espécimen paciente, o el control primero se agrega a una placa de micropozos. Se agrega a la enzima conjugada de T4 (método análogo), y se mezclan los reactivos. Resultado de una reacción de la competición entre la enzima conjugada y la tiroxina libre para un número limitado del anticuerpo que combina los sitios inmovilizados en el pozo.

Después de la terminación del periodo requerido de incubación, el anticuerpo límite de la enzima-Tiroxina conjugada es separada de la conjugación desatada de enzima -Tiroxina por un paso de lavado. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato conveniente para producir color.

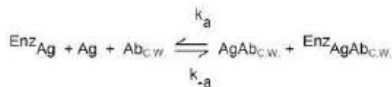
El empleo de varias referencias del suero de la concentración conocida de tiroxina libre permite la construcción de un gráfico de actividad y concentración. De la comparación a la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la concentración de Tiroxina Libre.

PRINCIPIO

Inmunoanálisis Competitivo de enzima

Método Análogo para T4 Libre (Tipo 5):

Los reactivos esenciales requeridos para una fase sólida de enzima en inmuno ensayo incluye el anticuerpo inmovilizado, enzima-antígeno conjugado y antígeno nativo. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, el conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y la conjugación del enzima-antígeno para un número limitado de sitios insolubles atados. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



$\text{Ab}_{\text{C.W}}$ = Anticuerpo Inmovilizado Monoespecifico. (Cantidad Constante)

Ag = Antígeno Nativo (Cantidad Variable)

Enz_{Ag} = Antígeno-Enzima Conjugada (Cantidad Constante)

$\text{AgAb}_{\text{C.W}}$ = Complejo Antígeno-Anticuerpo

$\text{Enz}_{\text{AgAb}_{\text{C.W}}}$ = Antígeno-Enzima Conjugada - Complejo Anticuerpo

k_a = Rango Constante de Asociación

k_{-a} = Rango Constante de Disociación

$K = k_a / k_{-a}$ = Equilibrio Constante

Después de logrado el equilibrio, la fracción anticuerpo-límite es separada del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática, en la fracción del anticuerpo-atado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Utilizando varias diversas referencias del suero de los valores del antígeno conocido, una curva a la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEDIDO

A. SUERO HUMANO DE REFERENCIA – 1.0 ml/vial - Frascos A-F

Seis (6) frascos de referencia del suero para tiroxina libre en las concentraciones aproximadas * de 0 (A), 0.40 (B), 1.25 (C), 2.10 (D), 5.00 (E) y 7.40 (F) ng/dl. Almacén a 2-8°C. Se ha agregado preservativo.

* Niveles exactos están dados en las etiquetas en base a lote específico.

Para unidades SI: 1ng/dl x 12.9 = pmol/L.

B. Reactivo Enzima T4 Libre - 13ml/vial - frasco icono

Un (1) frasco de peroxidasa conjugada de Tiroxina-horseradish (HRP) en una matriz proteína-estabilizada. Se ha agregado un preservativo. Almacén a 2-8°C.

C. Plato Cubierto con Anticuerpo de T4L - 96 pozos -icono

Una microplaca con 96 pozos cubierto con suero anti-Tiroxina y empaquetado en un bolso de aluminio con un elemento deshidratador. Almacén en 2-8°C.

D. CONCENTRADO LAVADOR (WASH) -- 20ml - icono

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Se ha añadido un preservativo. Almacén en 2-30 °C.

eA. Sustrato A -- 7ml/vial - icono S

Un (1) frasco que contiene tetrametilbenzidina (TMB) en búfer de acetato. Almacén en 2-8°C.

eF. Sustrato B -- 7ml/vial - icono S

Un (1) frasco que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en acetato. Almacén en 2-8°C. (Ver sección de Preparación de reactivo).

G. Solución de Paro – 8ml/vial - Icono

Un bote que contiene un ácido fuerte (1N HCl). Almacénese a 2-8°C.

H. INSERTO DE LA PRUEBA.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Vea el final del instructivo para diferentes configuraciones de los reactivos por el tamaño del equipo.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO .

- Una pipeta capaz de entregar los volúmenes 50µl & 100µl con una precisión de mejor de 1.5%.
- Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.350ml con una precisión mejor de 1.5%.
- Lavador de Micro placa o una botella de apretón (opcional).
- Lector de Microplato con una capacidad de absorbancia de 450nm y 620nm.
- Papel absorbente para retirar excesos de los pozos de la microplaca.
- Cubierta o plástico para la microplaca para los pasos de incubación.
- Aspirador (opcional) para los pasos de lavado.
- Contador de tiempo.
- Materiales del control de calidad

PRECAUCIONES

Para el uso de diagnóstico in vitro no para el uso interno o externo en seres humanos o animales

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el centro para el control de enfermedad/el instituto nacional de la salud, "Biosseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes serán la sangre, suero en tipo y observar las precauciones generalmente en la colección de muestras por veni-puntura. La sangre se debe recoger por venipuntura en un tubo plano de tapón rojo sin añadidos o anticoagulantes. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de 48 horas. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Antes de hacer el ensayo traer los reactivos y muestras a temperatura ambiente de 20°C-27°C. Evite congelar y deshelar. Cuando sea analizado en duplicado, se requiere 0.100ml del espécimen.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. Solución de Lavado.

Diluya los contenidos del concentrado lavador a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un contenedor de almacén adecuado. Guarde la solución diluida a temperatura ambiente 20-27°C hasta por 60 días.

2. Solución de Trabajo con Reactivo de Señal. – Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Coloque la tapa amarilla sobre el frasco transparente para una sencilla identificación. Mezcle y guarde a 2-8°C. Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, traiga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C).

- Ajuste el formato de los pozos de las microplacas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean probados en duplicado. Devuelva cualquier tira que no use de micropozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.
 - Mida con una pipeta 0.050 ml (50µl) de la referencia del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.
 - Agregue 0.100 ml (100µl) del Reactivo de Enzima de T4 Libre en cada pozo.
 - Remolina el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cubra.
 - Incuba 60 minutos en la temperatura ambiente.
 - Deseche el contenido del micro placa por la decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y seque la placa seca con el papel absorbente.
 - Agregue 300µl del buffer lavador (véase la sección de la preparación el reactivo), decántelo (golpee contra el papel absorbente) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga la instrucción del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón o pizeta, llene cada pozo presionando el envase (evitando las burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.
 - Agregue 0.100 ml (100µl) de solución de señal de trabajo a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- NO AGITE EL PLATO DESPUES DE ADICIÓN DEL SUSTRATO**
- Incuba en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
 - Agregue 0.050ml (50µl) de solución de paro en cada pozo y mezcle gentilmente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos
 - Lea la absorbancia en cada pozo a 450nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-630nm para minimizar las imperfecciones del pozo) en un lector de microplato. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregada la solución de sustrato.

CONTROL DE CALIDAD.

Cada laboratorio debe probar controles en los niveles en los rangos de hipotiroideo, eu-tiroideo y del hiper-tiroideo para supervisar funcionamiento del análisis. Estos controles se deben tratar como desconocidos y los valores determinados en cada método de prueba realizado. Las cartas del control de calidad se deben mantener para seguir el funcionamiento de los reactivos provistos. Los métodos estadísticos pertinentes se deben emplear para comprobar tendencias. La desviación significativa del funcionamiento establecido puede indicar el cambio inadvertido en condiciones o la degradación experimentales de los reactivo del kit. Los reactivos frescos se deben utilizar para determinar la razón de las variaciones.

CALCULO DE RESULTADOS

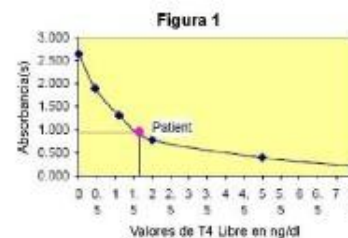
Una curva de reacción a cierta dosis se utiliza para comprobar la concentración de Tiroxina Libre en especímenes desconocidos.

- Registre la absorbancia obtenida de la impresora del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trace la absorbancia obtenidos para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de T4 Libre en ng/dl en el papel de gráfico lineal. (No promedie los duplicados del suero de referencia antes de imprimir.
- Dibuje la mejor curva que concuerde a través del trazado de puntos.
- Para determinar la concentración del T4 Libre para un desconocido, localizar el promedio de absorbancia para cada desconocido en el eje de la gráfica, encuentre el punto que interfecta en la curva, y lea la concentración (en ng/dl) del eje horizontal (eje-x) del gráfico (los duplicados del desconocido se promedian según lo indicado). En el ejemplo siguiente, el promedio de la absorbancia (0.964) del desconocido interfecta la curva de calibración en (1.65ng/dl) la concentración de T4 Libre. (Véase Figura1).

Nota 1: El software de reducción de información de computadora diseñada para los análisis de quimioluminiscencia puede ser usado también para la reducción de información. Los duplicados para los desconocidos pueden promediarse como se indican.(Ver figura 1).

ID. Muestra	Pozo Número	Abs [A]	Signif. Abs (A)	Valor (ng/dl)
Cal A	A1	2.650	2.612	0.00
	B1	2.666		
Cal B	C1	1.919	1.900	0.45
	D1	1.880		
Cal C	E1	1.339	1.306	1.10
	F1	1.273		
Cal D	G1	0.769	0.790	2.00
	H1	0.811		
Cal E	A2	0.396	0.400	5.00
	B2	0.404		
Cal F	C2	0.215	0.217	7.40
	D2	0.219		
Ctrl 1	E2	1.827	1.800	0.50
	F2	1.843		
Ctrl 2	G2	0.541	0.567	2.70
	H2	0.573		
Patient	A3	0.961	0.964	1.65
	B3	0.976		

* La información presentada en el Ejemplo 1 y la figura 1 es ilustrativa solamente y no debe ser usada como guía para la preparación de la curva con cada ensayo. Los valores asignados para los calibradores son de lote específico.



PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En la orden para que los resultados del análisis sean considerados válidos deben ser resueltos los siguientes criterios:

- La absorbancia del calibrador 0 ng/dl debe ser ≥ 1.3 .
- Cuatro fuera de seis POOL del control de calidad deben estar dentro de los rangos.

RIESGO DEL ANALISIS

A. Funcionamiento

- Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno de los pozos este llevado a cabo constante para la reproducción de resultados.
- El medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
- Lipemica alta o especímenes bemozizados que tengan similitud no deben ser usados.
- Si se utiliza más de un (1) plato, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
- La adición de la solución de sustrato inicia una reacción cinética, la cual termina con la adición de la solución de paro. Así también, la adición del sustrato y la solución de paro deben ser agregadas en la misma secuencia para eliminar cualquier derivación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de platos miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- El fallar al remover la solución adherida adecuadamente en los pasos de aspiración y lavado pueden resultar en resultados sospechosos.
- Use componentes del mismo lote. No mezcle los reactivos de diferentes equipos.
- La exactitud y precisión en el pipeteo, así como seguir el tiempo y temperaturas exactas son requerimientos esenciales. Cualquier desviación del procedimiento hecho por Monobind puede caer en resultados inexactos.
- Todos los estándares nacionales, regulaciones y leyes, incluidas, pero no limitadas, en los buenos procedimientos de laboratorio, deben ser seguidos estrictamente para asegurar la conformidad y el uso adecuado del reactivo.
- Es importante calibrar el equipo: ejemplo: pipetas, lectores, lavadores y/o equipos automatizados con este reactivo y desarrollar un mantenimiento preventivo.
- Riesgo del Análisis- como requerido por la marca CE IVD Directiva 98/79/EC – para este y otros dispositivos, hechos por Monobind, pueden ser requeridos.

B. Interpretación.

- Los resultados de laboratorio por si solos no son el único aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben basarse para una terapia, particularmente si el resultado crea conflictos con otras determinantes.

2. Para resultados válidos, unos controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos enlistados, así como los requerimientos del análisis.

3. Si los kits están alterados, tal como partes mezcladas de diferentes kits, lo cual puede producir falsos resultados en las pruebas, o si los resultados son interpretados incorrectamente, Monobind no se hace responsable.

4. Si la reducción de datos controlados de la computadora se utiliza para interpretar los resultados de la prueba, es imprescindible que los valores predichos para los calibradores caigan dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

5. Si un paciente, por alguna razón, da lecturas mayores que el calibrador de más alto valor repótese como tal. (Ejemplo: > 7.4 ng/dl No trate de diluir la muestra. Las variaciones de TBG en diferentes matrices no permite a la hormona de T4 Libre la dilución serialmente.

6. La concentración de suero de Tiroxina Libre es dependiente a una multiplicidad de factores: la función de la glándula tiroidea y su regulación, la concentración de la Globulina atada a la tiroxina (TBG) y el atado de la Tiroxina a la TBG (3, 4). Así, la concentración de Tiroxina Libre solitaria no es suficiente para comprobar un status clínico.

7. Los valores del suero de Tiroxina Libre puede elevarse bajo condiciones tales como el embarazo o la administración de anticonceptivos orales.

8. Un decremento en los valores de Tiroxina Libre se encuentra con las enfermedades de pérdida de proteínas, enfermedades de hígado certeros y la administración de Testosterona, difenilidanton o salicilatos. Una tabla de drogas y condiciones de interferencia, las cuales pueden afectar los valores de Tiroxina libre, ha sido compilada en el Journal de la Asociación Americana de Químicos Clínicos.

9. La interpretación de T4L se complica por una variedad de drogas que pueden afectar el atado de la T4 al sostén de proteínas de la hormona Tiroidea o interferir en su metabolismo con la T3. En infecciones serias no tiroideas (NTI) el diagnóstico de tiroidea puede resultar muy difícil. Desde que los pacientes en esta categoría pueden sufrir desde hipotiroidismo primario concomitante o desde hipotiroidismo secundario compensatorio. En casos como este se recomienda una evaluación de TSH sensitivo del paciente. Por favor vea el Catálogo Monobind #325-300.

10. En condiciones raras asociadas con variaciones extremas en la capacidad de atar albúmina para la T4, tales como la hipertixinemia disalbuminemia familiar (FDH) – La asignación directa de T4 Libre debe ser descartada.

11. Anticuerpos circulantes al T4 e inhibidores atados a la hormona puede interferir en el desarrollo del ensayo.

12. La Heparina esta reportada por tener efectos in Vitro e In Vivo sobres los niveles de T4 Libre. Las muestras de pacientes en terapia de heparina deben ser colectadas antes de la administración del anticoagulante.

"NO CREADA PARA MONITOREO EN RECIÉN NACIDOS."

RANGOS ESPERADOS Y VALORES

Un estudio de la población eutiroides adulta fue emprendido para determinar los valores previstos para el sistema de la prueba de T4 Libre EIA. El significado (R) valora las desviaciones de estándar (σ) y los rangos previstos ($\pm 2\sigma$) se presentan en la tabla 1.

TABLA 1
Valores esperados para la T4L Accubind de ELISA
(en ng/dl)

	Adultos (89 especímenes)	Embarazos (31 especímenes)
Significado (x)	1.40	1.50
Desviación Standard (σ)	0.30	0.37
Rangos Esperados ($\pm 2\sigma$)	0.8 – 2.0	0.76 – 2.24

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se espera encontrar por un método dado para una población de "persona-normal" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta que una gama interna de valores determinados por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CARACTERISTICAS DE ACTUACION

A. Precisión

La precisión inter e intra ensayo por el procedimiento del método de T4 Libre EIA en microplaca fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número (n), el valor medio (x), la desviación de estándar (σ) y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

En orden de validar la precisión intra ensayo del análisis de T4 Libre Accubind, veinte replicas de cada uno de los 3 sueros (rangos bajo, medio y alto para la curva de respuesta), fueron analizadas en el mismo ensayo. Fue obtenida una precisión de intra-ensayo de 3.25% a 10.98%.

TABLA2
Precisión Intra-Ensayo
En ng/dl

	Bajo 20	Medio 20	Alto 20
Número (n)	20	20	20
Significado	0.550	1.740	3.250
1 σ	0.061	0.074	0.106
% CV	10.98	4.26	3.25

En orden de validar la precisión del inter-ensayo de la T4 libre, un duplicado de cada 3 pozos de suero (rangos alto, medio, bajo para la curva de respuesta) fue analizada en 10 ensayos realizándose por un período de seis meses que envolvió 5 diferentes sets de reactivo y 3 diferentes técnicos. Se obtuvo una precisión de inter-ensayo de 6.01% a 10.81%.

TABLA 3
Precisión Inter-Ensayo
En ng/dl

	Bajo 10	Medio 10	Alto 10
Número (n)	10	10	10
Significado	0.480	1.410	3.490
1 σ	0.052	0.085	0.279
% CV	10.81	6.01	7.90

B. Método de Comparación.

La prueba de T4 Libre EIA fue comparada con un método de radioinmunoanálisis (RIA). Fueron usados especímenes biológicos de poblaciones de hipotiroideo, eutiroides e hipertiroideo (Los valores de rango desde 0.1ng/dl – 8ng/dl). El número total de tales especímenes fue 197. El último cuadro de ecuación de regresión y el coeficiente de correlación fue computado por el T4 EIA en comparación con el método de referencia, La información obtenida se muestra en la tabla 4.

TABLA 4
Análisis de Regresión Linear

Método	Significado (x)	Ecuación	Correlación
Monobind EIA "X"	1.56	Y=0.1034 + 0.9525*X	0.920
Predicado RIA "Y"	1.59		

Sólo pequeñas cantidades de diagonales entre este método y el método de referencia están indicados por la cercanía de los valores de significado.

C. Sensibilidad

El procedimiento de la prueba de Tiroxina Libre tiene una sensibilidad de 0.05 ng/dl. La sensibilidad fue comprobada determinando la variabilidad de los calibradores 0 del suero de ng/dl y usando la estadística de la certeza del 2 σ (95%) para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad: La reactividad cruzada del anticuerpo de la tiroxina Libre para seleccionar sustancias fue evaluada agregando cantidades masivas de la sustancia que interfería al suero de la matriz. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis del tiroxina necesitada para desplazar el mismo trazo de la cantidad.

Sustancia	Reactividad Cruzada	Concentración
I-Tiroxina	1.0000	-
d-Tiroxina	0.9800	10 μ g/ml
d-Triioditironina	0.0150	100 μ g/ml
I-Triioditironina	0.0300	100 μ g/ml
Iodotirosina	0.0001	100 μ g/ml
Diiodotirosina	0.0001	100 μ g/ml
Diioditironina	0.0001	100 μ g/ml
TBG	N/D	40 μ g/ml
Albúmina	N/D	40 μ g/ml
Fenilbutazona	N/D	10 μ g/ml
Fenitoína	N/D	40 μ g/ml
Salicilatos	N/D	500 μ g/ml

REFERENCIAS

1. Barker SB, "Determination of Protein Bound Iodine, Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948).
2. Chopra IJ, Solomon DH, and Ho RS, "A Radioimmunoassay of Thyroxine", J Clinical Endocrinol, 33, 885 (1971).
3. Young DS, Preston L, and Giberman U, "Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests", Clinical Chemistry, 21, 366 (1975).
4. Sterling L, "Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease", CRC Press, 19-51 (1975).
5. Halpern EP and Bowden RW, "Microencapsulated antibodies in radioimmunoassay: Determination of free Thyroxine", Clinical Chemistry, 25, 1581-1583 (1979).
6. Sjemilhois NR, Aasen RN and Ruckoff MC, "Thyroid function tests in diphenylhydantoin-treated patients", Can Chem, 21, 1385 (1977).
7. Nelson J.C. and Wilcox RB, "Analytical performance of Free and Total thyroxine assays", Clin. Chem. Vol, 42, 146-154 (1996).
8. Midgeley John, "Direct and Indirect Free Thyroxine Assay Methods in Theory and Practice", Clin. Chem, 47, 1353-1363 (2001).
9. Bayer MF and McDougall IR, "Radioimmunoassay of free Thyroxine in serum: comparison with clinical findings and results of conventional thyroid-function tests", Clin Chem, 26, 1186-1192 (1980).
10. Anthony GN, Jackson RA et al, "Misleading results from immunoassays of serum free Thyroxine in the presence of rheumatoid factor", Can Chem, 43, 957-952 (1997).
11. Worsell WRD, "A theoretical analysis of the distribution of thyroxine among sites on the thyroxine binding globulin, thyroid binding globulin and serum albumin", Res Comm Chem Pathology-Pharmacology, 16, 541-549 (1977).