

Reactivo para la Determinación de Triyodotironina

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo de Laboratorios Clínicos y de Gabinetes
Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Inmunoensayo de la Enzima de FT3

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la hormona triyodotironina libre en suero humano

INTRODUCCIÓN

Triyodotironina, es una hormona tiroidea que circula en la sangre casi completamente unida a proteínas transportadoras (>99.5%). La principal proteína transportadora es la TBG. Sin embargo solamente la porción libre de triyodotironina se cree que es la responsable de la acción biológica. Además, las concentraciones de las proteínas transportadoras se alteran en muchos cuadros clínicos tales como el embarazo. En individuos con función tiroidea normal, como las concentraciones de proteínas transportadoras cambian, los niveles de T3 total se modifican y los niveles de T3 libre pueden permanecer constantes. Por ejemplo, el incremento en los niveles de triyodotironina asociados con el embarazo, anticonceptivos orales, terapia de estrógenos resulta en niveles de T3 variables mientras las concentraciones de T3 libre permanecen básicamente sin cambio.

Esta metodología de inmunoanálisis de enzima en micro plato provee la técnica con sensibilidad óptima mientras se requieren pocas manipulaciones técnicas en una determinación directa de T3 Libre. En este método, el suero de referencia, el espécimen del paciente, o control es primero añadido a un pozo de microplato. La enzima-T3 conjugada (método análogo) es añadida, y entonces los reactivos son mezclados. Una competencia a la reacción resulta entre la enzima conjugada y la triiodotironina libre para un número limitado de anticuerpo combinando los sitios inmovilizados sobre el pozo.

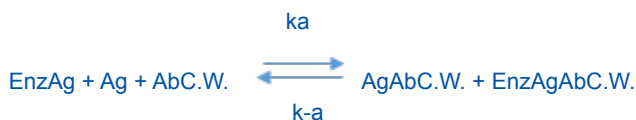
Después de la terminación del período requerido de la incubación, la conjugación atada del anticuerpo enzima-triyodotironina es separada de la conjugación desatada de T3-enzima por la aspiración o la decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un substrato conveniente para producir color. El empleo de varias referencias del suero de la concentración conocida de la triiodotironina permite la construcción de un gráfico de la actividad y de la 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 Triyodotironina Libre

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Inmunoensayo Enzimático Competitivo-Método Análogo para T3 Libre. Los reactivos esenciales requeridos para una fase sólida de inmuno ensayo de enzima incluyen el anticuerpo T3 inmovilizado, enzima-T3 conjugada y antígeno nativo T3 Libre. La enzima T3 conjugada no debe tener mediciones atadas al suero de las proteínas especialmente TBG y albu-

mina. El método alcanza este logro.

Una vez mezclando el anticuerpo inmovilizado, la Enzima-T3 conjugada y suero que contienen el antígeno T3 Libre nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno T3 Libre nativo y la conjugación del enzima-T3 para un limitado número de sitios insolubles obligatorios. La interacción es ilustrada por la siguiente ecuación:



AbC.W. = Anticuerpo mono específico inmovilizado (cantidad constante)

Ag = Antígeno Nativo (cantidad variable)

EnzAg = Enzima-antígeno conjuado (cantidad constante)

AgAbC.W. = Complejo antígeno-anticuerpo

EnzAg AbC.W. = Enzima-antígeno conjugado- Complejo anticuerpo

k_a = Tasa constante de asociación

$k-a$ = Tasa constante de disociación

$K = k_a / k-a =$ Equilibrio constante

Después de que se logre el equilibrio, la fracción anticuerpo-limite se separa del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción anticuerpo-limitado es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno libre. Utilizando varias diversas referencias del suero de puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit de 2-8°C después de su recepción y cuando no este uso.
2. Mantenga los pocillos de microtitulación en una bolsa sellada con desecantes.

PRECAUCIONES

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 HIV 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligroso y capaz 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, "Biosafety en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras serán séricas y deben tomarse las precauciones habituales en la colección de muestras por medio de punción venosa. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, debe obtenerse una muestra de suero de ayuno por la mañana. La sangre debe colectarse en un tubo de venopunción sin aditivos o barrera de gel. Permitir que la

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

sangre coagule, Centrifugue el espécimen para separa el suero de las células.

REACTIVOS

Materiales incluidos en el equipo:

1. Placa de micropozos cubiertos de anticuerpo anti-T3, 96 pozos
2. Reactivo enzima conjugada fT3. 1 Frasco
3. Estándares de referencia T3, 1 juego
Para unidades SI: $1 \text{ pg/mL} \times 1.536 = \text{pmol/L}$

**** Los niveles exactos están impresos en las etiquetas sobre una base específica del lote.**

4. Sustrato A. 1 Frasco
5. Sustrato B. 1 Frasco
6. Solución de paro (3N HCl). 1 Frasco
7. Solución de lavado concentrado. 1 Frasco

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Agua destilada
2. Pipetas de precisión 0.05 ml, 0.1 ml, 0.3 ml, 1.0 ml
3. Puntas desechables para pipetas
4. Lavador de microplaca o botella comprimible (opcional)
5. Tubos de ensayo para dilución de la Enzima Conjugada para mezclar Reactivo de Color A y Reactivo de Color B
6. Lector de Microplaca
7. Mezclador tipo Vortex o equivalente
8. Papel absorbente
9. Reloj
10. Materiales de Control de Calidad

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben alcanzar temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Búfer de lavado, diluir el contenido de la solución de lavado concentrado en 1000 mL de agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacene a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta de la solución de lavado concentrado. Es esencial que todo la solución de lavado concentrado se disuelva, en caso de formación de cristales en este concentrado, colocar en baño maria (37°C) por 5 minutos o almacenando el concentrado de lavado a temperatura ambiente.
3. Solución de sustrato de Trabajo, preparar antes de uso. Determinar la cantidad de reactivo necesario y prepare mezclando porciones iguales de sustrato A y sustrato B en un recipiente adecuado. Por ejemplo, agregar 1 mL de A y 1 mL de B para 2 tiras de ocho pocillos (se hace un ligero exceso de la solución). Utilizar dentro de 24 horas después de la preparación para el máximo rendimiento de la prueba.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Coloque el número deseado de pozos para cada suero de referencia, control y muestras de los pacientes por duplicado. Coloque cualquier tira que no use de los micropozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, séllela y almacénela entre 2-8°C.
2. Agregar 50µL de sueros de referencia, control y muestras dentro de los pozos apropiados.
3. Agregar 100 µL de la solución de enzima conjugada T3 a todos los pozos.
4. Mezcle cuidadosamente la placa durante 20-30 segundos y cúbrala.
5. Incube 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Remueva la mezcla en incubación al decantar el contenido de la microplaca en el contenedor de desechos.
7. Lavar con solución búfer de lavado (300 µL) (Ver la sección de Pre-

paración del Reactivo) y vaciar los pozos, hasta llegar a un total de 3 ciclos. Golpear suavemente la placa contra un papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

8. Añada 0.100 mL (100µL) de Solución de sustrato de trabajo a todos los pozos (Ver la sección de Preparación del Reactivo). **Siempre agregar los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia del tiempo de reacción entre cada uno de los pozos. Mezclar por 10 segundos.**
9. Incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Parar detener la reacción agregar 50 µL de solución de paro a cada pozo y mezcle cuidadosamente por 15-20 segundos. **Siempre agregar los reactivos en el mismo orden para minimizar la diferencia del tiempo de reacción entre cada uno de los pozos. Mezclar por 10 segundos.**
11. Lea la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm para minimizar las imperfecciones) en un lector de microplaca. Los resultados deben leerse en treinta minutos después de la adición de la solución de paro.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe probar controles en los niveles en la gama hipotiroidea, eu tiroidea e hipertiroidea para supervisar el funcionamiento del análisis. Estos controles se deben tratar como desconocidos en cada procedimiento de la prueba. El control de calidad se debe llevar a cabo para seguir el funcionamiento de los reactivos provistos. Los métodos estadísticos pertinentes se deben emplear para comprobar tendencias. Cada laboratorio debe establecer sus límites aceptables del análisis. En adición, la absorbancia máxima debe ser consistente con la experiencia pasada. La desviación significativa del funcionamiento establecido puede indicar el cambio inadvertido en condiciones o la degradación experimentales de los reactivos del kit. Reactivos frescos se deben utilizar para determinar la razón de las variaciones.

RESULTADOS

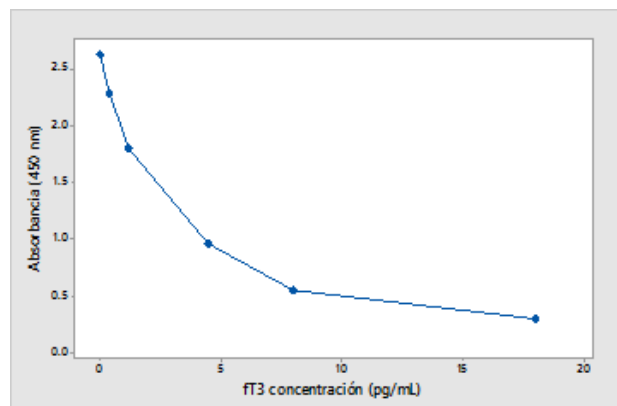
1. Una curva de la reacción a cierta dosis se utiliza para comprobar la concentración de Triiodotironina Libre en especímenes desconocidos.
2. Registre la absorbancia obtenida del listado del lector de la microplacas conforme al ejemplo 1.
3. Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de fT3 en pg/ml en el papel de gráfico line-ar (no haga un promedio de los duplicados de las referencias del suero antes de trazar).
4. Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
5. Para determinar la concentración de fT3 para un desconocido, localizar la absorbancia media de los duplicados para cada uno desconocido en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en pg/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el ejemplo siguiente, la absorbancia media (1.799) (interseca la curva estándar a (1.2 pg/ml) de la concentración de fT3 (Ver ejemplo de la curva estándar).

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de la curva estándar están ilustrados solamente y no deben utilizarse en lugar de una curva estándar preparada con cada ensayo.

Free T3 (pg/mL)	Absorbancia (450 nm)		
	I	II	Media
0.0	2.639	2.615	2.627
0.4	2.330	2.259	2.280
1.2	1.835	1.753	1.794
4.5	0.939	0.975	0.957
8.0	0.537	0.569	0.553
18.0	0.301	0.287	0.294

ID	DO	Valor
Desconocido 1	1.799	1.2 pg/mL



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A) Funcionamiento del análisis

- Muestra(s), las cuales estén contaminadas microbiológicamente, no deben ser usadas en el análisis. Especímenes con alta lipemia y/o hemolizados no deben ser usados. Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea constante para reproducir los resultados. El pipeteo de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
- La adición de la solución del sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de paro. Por lo tanto, la adición del sustrato y la solución de paro debe ser agregada en la misma secuencia para eliminar en cualquier momento la desviación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos. La falla en retirar la solución adecuadamente en el paso del lavado y de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.

B) Interpretación

- 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.
- Se conoce que muchas drogas afectan el atado de Triiodotironina a la hormona tiroidea que acarrea la proteína o su metabolismo a la T3 y complica la interpretación de resultados de T3 libre⁽³⁾.
- Anticuerpos circulantes de T3 e inhibidor de la hormona-unida puede interferir⁽⁴⁾.
- La heparina ha sido reportada de tener efectos in vivo e in Vitro sobre las concentraciones de T3 Libre (5). Así pues, no se obtienen muestras en el que estos anti-coagulantes hayan sido usados.

- En enfermedad severa no tiroidea (NTI), el gravamen del status del tiroides viene a ser muy difícil. Las mediciones de TSH están recomendadas para identificar la disfunción tiroidea.
- Condiciones familiares disalbuminémicas puede darse resultados erróneos sobre los análisis de T3 Libre⁽⁷⁾.

NOTA: "NO INTENCIONANDA PARA EL MONITOREO EN RECIEN NACIDOS."

VALORES ESPERADOS

Un estudio de la población adulta eutiroidea fue tomado para determinar los valores del Sistema de Prueba T3 libre (pg/mL). Los valores promedios (X), desviaciones estándar (SD) y Rangos esperados (± 2 SD) son presentados en la siguiente tabla:

Valores esperados para el Sistema de Prueba de ELISA T3 Libre (pg/mL)		
	Adulto (110 muestras)	Embarazo (75 muestras)
Promedio (X)	2.8	3.0
Desviación estándar	0.7	0.6
Rangos esperados	1.4 - 4.2	1.8 - 4.2

Es importante tener presente que el establecimiento de rangos de los valores es dependiente de varios factores, la especificidad del método, la población probada, y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender en el rango de valores esperado sólo establecido por el Fabricante hasta que un rango propio de la región pueda determinarse por los analistas que usan el método con una población indígena al área en que el laboratorio se localiza.

CARACTERÍSTICAS DE DESEMPEÑO

PRECISIÓN

Dentro de y entre la precisión del ensayo del sistema de Prueba EIA del T3 Libre es determinado por los análisis en tres niveles diferentes, de control combinado del suero. El número, valores promedios, desviación estándar y coeficiente de variación, cada uno de éstos controles de suero se muestran en la tabla siguiente:

Precisión Intra-ensayo (pg/mL)

Muestra	N	X	S.D.	C.V
Bajo	20	1.37	0.16	11.9%
Normal	20	4.21	0.17	4.9%
Alto	20	7.1	0.17	2.4%

Precisión Inter-ensayo (pg/mL)

Muestra	N	X	S.D.	C.V
Bajo	10	1.4	0.15	10.7%
Normal	10	4.4	0.23	5.2%
Alto	10	7.0	0.30	4.2%

*Medido en diez experimentos por duplicado en un periodo de diez días.

EXACTITUD

El sistema de microplaca EIA de la prueba T3 Libre fue comparada con el método de radioinmunoensayo de tubo recubierto. Las muestras biológicas de la población de hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo fueron usadas (Rangos de valores desde 0.1 pg/mL – 14 pg/mL). El número total de muestras fue de 85. La ecuación de regresión por mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación fueron computados por este sistema de prueba EIA T3 Libre en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos son mostrados en la siguiente tabla:

Método	Media (X)	Análisis de ecuación de regresión por mínimos cuadrados	Coefficiente de correlación
Éste método	3.4	$y=0.15+0.925(x)$	0.955
Referencia	3.5		

Solo cantidades leves de tendencia son indicadas entre éste método y el de referencia por la cercanía de los valores de la media. La ecuación del mínimo cuadrado de regresión y la correlación del coeficiente indica un acuerdo de método excelente.

SENSIBILIDAD

Esta prueba tiene una sensibilidad de 0.05 pg/mL. La sensibilidad fue comprobada determinando la variabilidad del calibrador 0 pg/mL y utilizando estadísticamente 2SD (95% certeza) para calcular la dosis mínima.

REFERENCIAS

1. Pederson, K.O, *Scand. J. Clin. Lab Invest*, 34, 247 (1974)
2. Wild, D., *Immunoassay Handbook*, Stockton Press, p339 (1994).
3. Wenzel, K.W., *Metabolism*, 30, 717 (1981)
4. Bhagat, C., et.al, *Clin Chem*, 29, 1324 (1983-).
5. Lundberg, P.R., et.al, *Clin Chem*, 28, 1241 (1982).
6. Melmed, S. et.al, *J Clin Endocrinol Metab*, 54, 300 (1982).
7. Lalloz M.R., et al, *Clin Endocrinol*, 18, 11 (1983).

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA