

Immunoensayo para la Medición de la Cantidad Total de Sitios Aglutinantes Disponibles para las Hormonas Tiroideas en Suero o Plasma Humano

**Solo para diagnóstico In Vitro
Para uso exclusivo en laboratorio clínico o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C**

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de T3-Uptake

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de los sitios aglutinantes disponibles para las hormonas tiroideas en suero o plasma humano.

INTRODUCCIÓN

La glándula tiroidea bajo el control regulador de la hormona tirotrópica, secreta tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) dentro de la circulación general. Las hormonas liberadas no circulan como moléculas libres sino que están casi totalmente (99.9%) unidas a proteínas específicas del suero.

Tres fracciones de proteína con afinidades variantes y capacidades para la interacción con T3 y T4 han sido identificadas por medio de la electroforesis inversa. La globulina que fija la Tiroxina (TBG) lleva el 65~75% del total de la concentración circulante. La pre albúmina que fija la Tiroxina (TBPA) tiene una avidéz intermedia para la tiroxina (lleva aproximadamente el 15 25%), pero poco o casi nada de avidéz para la triyodotironina. La Albúmina con una baja afinidad pero una alta capacidad lleva un 10% de tiroxina y un 30% de la triyodotironina disponible.

Debido a que los procesos metabólicos están regulados completamente por la concentración de las hormonas tiroideas libres, las cuales están relacionadas a la inversa a los niveles de las proteínas Hamolsky desarrolló en 1957 una evaluación de la capacidad binding del suero humano. En éste método temprano, la T3 radioactiva se añadió a un espécimen de sangre entera. Después de un período de incubación, la muestra fue centrifugada y se lavaron las células rojas. La captación de radioactividad de las células rojas estaba relacionada a la inversa de la capacidad de fijación del suero. Aunque este método tenía severas limitaciones, probó ser una herramienta valiosa de diagnóstico.

Mejorías técnicas en la metodología del ensayo de la prueba del T uptake resultaron cuando varios agentes de separación tales como el carbón recubierto, resinas de intercambio iónico, albúmina desnaturalizada, silicatos. Anticuerpos polímeros orgánicos fueron empleados en lugar de las células rojas.

Esta metodología de Microelisa proporciona óptima sensibilidad mientras requiere poca manipulación por el técnico. En éste método, el suero de referencia, la muestra del paciente, o el control se añade primero a un pozo de Microelisa. La Enzima T4 conjugada y la Tiroxina (T4) son añadidas, entonces se mezclan los reactivos. Las proteínas combinadas de la muestra reaccionan con la tiroxina, pero no con el conjugado de la enzima. Esto lleva a una fusión mas alta de la enzima conjugada al anticuerpo combinando los sitios inmovilizados sobre el pocillo mientras aumenta la capacidad de fusión de la muestra.

Después de completar el tiempo requerido de incubación, el anticuerpo

fusionado se separa de la enzima tiroxina conjugado no fusionado por aspiración o decantación. La actividad de la enzima en la superficie del pocillo se cuantifica por la reacción con un sustrato adecuado para producir color.

El empleo de varias referencias de suero de capacidad de fusión no saturada conocida para fusionar la hormona Tiroidea permite la construcción de una gráfica de absorbancia y de concentración. De la comparación de la curva de respuesta a dosis, la absorbancia de una muestra desconocida puede ser correlacionada con la capacidad de fusión de la hormona Tiroidea.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Immunoensayo enzimático competitivo

Los componentes requeridos para evaluar la capacidad de fusión del suero humano son la enzima-T3, tiroxina, la proteína fusionadora (proteína unida) (P), y el anticuerpo inmovilizado de tiroxina (Ab).

Al mezclar la enzima conjugada y la Tiroxina con la muestra, una acción de fusión resulta entre las proteínas vinculadoras del paciente y la tiroxina añadida pero no con la enzima conjugada. Esta interacción se representa abajo:

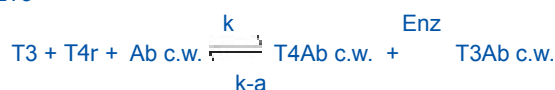


T4 = Tiroxina añadida (cantidad constante)

P = Proteínas Especificas de vinculación (cantidad variante)

La tiroxina añadida (T4) que no se consumió durante la reacción 1 entonces compite con la enzima conjugada T3 para un número limitado de sitios de vinculación insolubilizados. La interacción se ilustra por la siguiente ecuación.

EnzT3



Ab.c.w. = Anticuerpo Inmovilizado (Cantidad Constante)

T4r = Tiroxina añadida sin reaccionar en una reacción (Cantidad Variable)

EnzT3 = Enzima -Antígeno Conjugado (Calidad Constante)

T4Ab.c.w. = Complejo Tiroxina – Anticuerpo

EnzT3 Ab.c.w.=Enzima Conjugada T3-Complejo anticuerpo

Ka = Proporción Constante de Asociación

K -a = Proporción Constante de Disasociación

K = ka / k-a = Equilibrio Constante

Después de lograr el equilibrio, la fracción atada al anticuerpo es separada del antígeno-enzima no fusionado por decantación o aspiración. La actividad de la enzima dentro de la fracción fusionada al anticuerpo es directamente proporcional a la capacidad fusionadora de la muestra. Por lo tanto, en el hipotiroidismo, las proteínas fusionadoras están relativamente instauradas (debido al bajo nivel de hormonas tiroideas) resultando en un consumo mas alto de tiroxina añadida que de una muestra eutiroides. Esto lleva a una fusión mas alta de la enzima Tiroxina Con-

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

jugado causada por la concentración reducida de la tiroxina disponible. En el hipertiroidismo lo inversa es cierto. Las proteínas fusionadoras están relativamente saturadas con tiroxina (debido al alto nivel de hormona Tiroidea) resultando en un consumo mas bajo de la tiroxina añadida. La tiroxina remanente es relativamente mucho mas alta que una muestra de eutiroides resultando en una fusión anticuerpo enzima - tiroxina mas baja debido al aumento de la competición de la tiroxina por los sitios limitados de anticuerpos.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. **Referencias de Suero Humano.** Iconos A-D. Cuatro (4) viales de suero de referencia de la capacidad fusionadora de la hormona Tiroidea insaturada a niveles* aproximados %U. Un conservador ha sido añadido. ***Los niveles exactos se indican en las etiquetas en una base específica de un lote.**
2. **Enzima T3-Uptake conjugado.** Un (1) vial de tiroxina-(rábano picante) peroxidasa (HRP) Conjugado y tiroxina, en una matriz de albúmina estabilizante. Un conservador ha sido añadido. Almacene de 2 a 8 °C.
3. **T3-uptake Conjugado Buffer** Una (1) botella del reactivo conteniendo el buffer, tinte naranja y un conservador. Almacene a 2 a 8°C.
4. **Microplaca cubierta con Anticuerpo T4 -96 pocillos** Una Micro-Elisa de 96 pozos cubierta con suero bovino anti tiroxina y empaquetado en una bolsa de aluminio con una agente secante. Almacene de 2 a 8 °C.
5. **Solución de Lavado** Un (1) frasco conteniendo una solución salina tamponada. Un conservador ha sido añadido. Almacene a 2 a 30°C.
6. **Substrato A:** Un (1) frasco conteniendo tetrametilbencidina (TMB) en buffer. Almacene de 2 a 8°C.
7. **Substrato B:** Un (1) frasco obteniendo Peróxido de Hidrogeno (H₂O₂) en buffer. Almacene de 2 a 8°C.
8. **Solución de Frenado:** Un (1) frasco conteniendo un ácido fuerte (1N HCl). Almacene de 2 a 30°C.
9. **Instructivo**

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Una Pipeta capaz de dispensar 25 µL volúmenes con una precisión mejor al 1.5%.
2. Dispensador(es) para entregas repetitiva de volúmenes de 0.100 mL y de 0.300 mL con una precisión de mejor al 1.5%.
3. Dispensador de volumen ajustable de (20-200 µL) y (200-1000 µL) para diluciones del conjugado y de substrato.
4. Lavador de Microplaca (opcional).
5. Un Lector de Microplaca con una capacidad de absorción de longitud de onda de 450 nm y 620 nm .
6. Tubos de ensayo para la dilución de la enzima conjugada y de los substratos A y B.
7. Papel absorbente para secar los pocillos del Micro Elisa.
8. Envoltura de plástico o una cubierta para los pasos de Incubación.
9. Aspirador de vacío (opcional) para los paso de lavado.
10. Reloj.
11. Materiales para el control de calidad.

Nota 1: No utilice los reactivos mas allá de la fecha de caducidad

Nota 2: Los reactivos que han sido abiertos mantienen su estabilidad por sesenta días (60) cuando se almacenan a 2 - 8 °C.

Nota 3: Los reactivos anteriores son para una sola microplaca de 96 pocillos

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES PARA LOS USUARIOS

1. Únicamente para uso diagnóstico *In Vitro*
2. No es para uso interno ni externo en humanos ni en animales
3. Todos los productos que contienen suero humano se ha encontrado que no son reactivos al Antígeno de superficie de la Hepatitis B ni a los anticuerpos HIV 1&2 y HCV pruebas requeridas por el FDA . Ya que ninguna prueba puede asegurar por completo que los agentes infecciosos estén ausentes, los productos con suero humano deben de manejarse como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades. Buenos procedimientos de laboratorio para el manejo de productos con sangre pueden encontrarse en the Center for Disease Control 1 National Instituto of Health, «Biosafely in Microbiological end Biomedical Laboratories,» 2nd Edition, 1988, HHS Publication No. (CDC) 88-8395.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

Se deben tener las precauciones normales en la recolección de muestras por medio de una punción venosa. Para establecer los valores reales, la muestra debe ser obtenida por la mañana. La sangre debe ser colectada en un tubo con tapón rojo, sin aditivos o anticoagulantes. Permitir que la sangre coagule. Posteriormente centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. **Reactivo de Trabajo A - T3U Reactivo Solución de Enzima.**
Diluya el reactivo de Enzima T3U 1:11 con el T3-uptake Buffer Conjugado en un recipiente adecuado. Por ejemplo, diluya 160 µL del conjugado con 1.6 mL del buffer para 16 pocillos (Se prepara un poco más de la solución.) Este reactivo debe utilizarse en un plazo de 24 horas para un máximo rendimiento de la prueba. Almacene a 2 8°C. **Fórmula General:**
Cantidad requerida del Buffer = Número de pozos * 0.1
Cantidad necesaria de la Enzima T3 = # de pozos = *0.01 i.e. :
16 x 0.1 = 1.6 mL para un T3/T4 Enzima Conjugada.
16 x 0.01 = 0.16 mL (160 µL) para el T3 de enzima conjugada.
2. **Solución de lavado:** Diluya el contenido de solución de lavado concentrado (20 ml) en agua destilada o desionizada para formar un volumen final de 1,000 mL. en un recipiente adecuado. Almacene a temperatura ambiente 20 a 27 °C por no más de 60 días.
3. **Solución de substrato de trabajo:** Vacíe el contenido del frasco ámbar etiquetado como "Solución A" en el frasco claro etiquetado como "Solución B", coloque la tapa amarilla en el frasco claro para su fácil identificación. Mezcle y etiquete como corresponde. Almacene de 2 a 8 °C. Use en un plazo de 60 días. Para periodos de uso mas largos determinar la cantidad de reactivo necesario y preparar mediante la mezcla de partes iguales de los sustratos A y B en un recipiente adecuado. Por ejemplo, añadir 1 mL de "A" y 1 mL de "B" por dos (2) tiras de ocho pozos (Se hace un ligero exceso de solución. Desechar la porción no utilizada). **Nota: No utilice la solución de substrato de trabajo si presenta un color azul.**

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes del procedimiento del ensayo, lleve estándares de referencia y con-

troles a temperatura ambiente (20-27°C)

1. Coloque la cantidad deseada de micropozos en el soporte para cada suero de referencia, control y muestras de pacientes para ser usadas en el ensayo por duplicado.
2. Agregue 0.025 mL (25 µL) de los sueros de referencia apropiados, control o muestra dentro del pozo asignado.
3. Agregue 0.100 mL (100 µL) del Reactivo Trabajo A (T3U Reactivo Solución de la Enzima a todos los pozos).
4. Agite cuidadosamente la placa de 20 a 30 segundos para asegurar un buen mezclado y cúbralo.
5. Incúbelo por 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Deseche el contenido del placa por decantación o por aspiración. Si es por decantación seque el plato con papel absorbente.
7. Agregue 300 µL de buffer de lavado (wash buffer) (Vea la Sección de Preparación de Reactivo), decante (voltee y secar) o aspire. Repita dos veces más el lavado para un total de tres lavados. Un lavador automático o manual de platos puede ser utilizado. Siga las instrucciones del fabricante para el uso adecuado. Si se emplea un botella blanda llene cada pocillo oprimiendo el contenedor (evitando las burbujas de aire) para dispensar el lavado. Decante el lavado y repita dos (2) veces mas.
8. Añada 0.100 mL (100 µL) de Solución de Substrato de Trabajo a todos los pozos (Vea la sección de Preparación de Reactivo). **Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias en el tiempo de reacción entre pozos. NO SACUDA LA PLACA DESPUÉS DE AGREGAR EL SUBSTRATO.**
9. Incube a temperatura ambiente durante quince (15) minutos.
10. Agregue 0.050 mL (50 µL) de la Solución de Paro a cada pozo y mezcle cuidadosamente durante 15 - 20 segundos. **Siempre añada los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre pozos.**
11. Lea la absorbancia en cada pozo a 450 nm (Utilizando una referencia de longitud de onda de 620-630 nm para minimizar la imperfecciones de los pocillos) en un lector de MicroElisa. **El resultado debe de leerse dentro de los treinta minutos después de añadir la solución paro.**

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe probar los controles a niveles del rango hipotiroideo, eutiroideo y hipertiroideo para vigilar el funcionamiento de la prueba. Estos controles deben de ser tratados como desconocidos y como valores determinados. Gráficas de Control de Calidad deben de mantenerse para seguir el rendimiento de cada de los reactivos proporcionados. Métodos pertinentes de estadística deben de emplearse para descubrir las tendencias. El laboratorio individual debe de fijar límites aceptables para el rendimiento de una prueba. Además, la absorbancia máxima debe de ser consistente con la experiencia pasada. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar cambios no notados en las condiciones del experimento o la degradación de los reactivos del estuche. Reactivos frescos deben de utilizarse para determinar la razón de las variaciones.

PARÁMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para que el ensayo sea considerado válido, los siguientes criterios deben ser encontrados:

- La absorbancia (D.O.) del Calibrador A debe ser ≥ 1.3
- Cuatro de seis controles de calidad deben encontrarse dentro de los rangos establecidos.

CALCULO DE RESULTADOS

Una curva de respuesta a la dosis es utilizada para establecer la capaci-

dad de vinculación de la tiroides no saturada en muestras desconocidas.

1. Anotar la absorbancia obtenida del la impresión del lector del Micro Elisa como se muestra en el Ejemplo 1.
2. Trace la absorbancia de cada referencia de suero duplicada contra el porcentaje correspondiente de T3-uptake (%U) sobre papel para graficar (no debe promediar los duplicados de los sueros de referencia antes del trazado).
3. Conecte los puntos con la curva de mejor forma.
4. Para determinar el porcentaje del T3-uptake para un desconocido, localice el promedio de la absorbancia de los duplicados de cada desconocido sobre el eje vertical de la gráfica, encuentre el punto de intersección sobre la respuesta de la referencia, y lea el % del T uptake (%U) desde el eje horizontal de la gráfica (los duplicados del desconocido pueden promediarse como se indica). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia 1.690 (cruza la curva de referencia a (26.6 %U) (Vea la Figura 1).

Nota: Es importante revisar la concentración de los estándares en su etiqueta correspondiente.

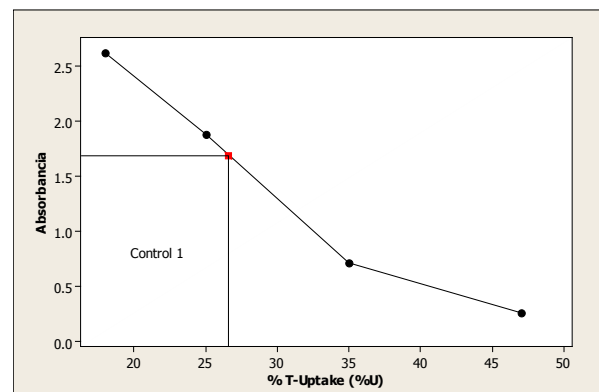
I.D. de la Muestra	Número de Pozo	Abs (A)	Media Abs (B)	Valor %U
Cal A	A1	2.644	2.622	18
	B1	2.600		
Cal B	C1	1.888	1.880	25
	D1	1.872		
Cal C	E1	0.710	0.718	35
	F1	0.726		
Cal D	G1	0.265	0.256	47
	H1	0.247		
Ctrl 1	A2	1.701	1.690	26.6
	B2	1.680		
Ctrl 2	C2	0.330	0.314	45.5
	D2	0.298		

Nota: Los datos presentados en el ejemplo 1 y la figura 1 son solo para ilustración y no deben ser utilizados en lugar de una curva calibrada con cada ensayo.

El T-Uptake también puede ser expresado como T-Uptake Ratio. Divida el %U entre 30% para convertir en T-Uptake Ratio. Ver ejemplo:

Ejemplo #2:

$$27.3\%U / 30\% = 0.910$$



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. El Funcionamiento de la Prueba:

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para resultados reproducibles.
2. El pipeteo de muestras no debe prolongarse más de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
3. Si se utiliza mas de una 1 placa, se recomienda repetir la curva de respuesta de dosis.
4. La adición de la solución de los substratos inicia una reacción cinética, la cual se termina por la adición de la solución de paro. Por lo tanto la adición del substrato y la solución paro deben de añadirse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
5. Los lectores de Microplaca miden verticalmente. No toque el fondo de los pocillos.
6. El fallo al remover soluciones adherentes durante la aspiración o la decantación en los pasos del lavado puede resultar en una replicación pobre o en resultados falsos.
7. Utilice componentes del mismo lote. No mezcle reactivos de diferentes lotes.

B. Interpretación:

1. La Prueba T3-Uptake depende de una multiplicidad de factores: la glándula tiroidea y su regulación, la concentración de la globulina que fija la tiroxina (thiroxine binding globulin) (TBG), y la fijación de la hormona Tiroidea a la TBG. Por lo tanto, la Prueba sola de T-Uptake no es suficiente para valorar estados clínicos.
2. El índice de la tiroxina libre (FTI), la cual es el producto del Promedio del T-Uptake Ratio y la concentración total de la tiroxina, ha ganado una amplia aceptación clínica como una evaluación mas exacta del estado de la tiroidea. El valor de la FTI compensa cualquier condición o droga, tales como el embarazo o estrógenos, los cuales alteran los niveles del TBG y del T4 pero no cambian el estado metabólico (thyrometabolic status). Una tabla de referencia de drogas y condiciones que afectan la Prueba del T UpTake ha sido recopilada por el Journal of the American Association of Clinical Chemists.

RANGOS DE VALORES ESPERADOS

Se realizo un estudio en una población adulta con eutiroidismo (85 muestras), se determinaron los valores esperados del T-uptake y se presentan en la tabla 1.

TABLA 1

Los Valores Esperados para el Sistema de Prueba T3-Uptake EIA

Estado de la Tiroides	% T Uptake	T (Radio)
Eutiroides	25 - 35	0.83 1.17
[Hipotiroides o fijación excesiva de TBG]	< 25	< 0.83
[Hipertiroides o saturación con TBG]	>35	> 1.17

Es importante mantener en mente que el establecimiento de un rango de valores lo cuales se espera encontrar por un método dado para una población de personas "normales" depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población probada y la precisión del método en las manos del analista. Por éstas razones cada laboratorio debe depender del rango de valores establecidos por el Fabricante único

amente hasta que un rango "domestico" puede ser determinado por el analista utilizando el método con una población indígena del área donde se localiza el laboratorio.

CARACTERISTICAS DE DESEMPEÑO

A. Precisión

La precisión dentro y entre de la prueba del Sistema de Prueba del T-Uptake Microelisa EIA fueron determinados por de tres niveles diferentes de control de suero. El numero, los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de la variación de cada uno de éstos controles se presentan en la Tabla 2 y la Tabla 3.

TABLA No. 2

Precisión dentro del Ensayo (Valores en %U)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Baja	24	28.7	0.39	1.37%
Normal	24	37.8	0.51	1.36%
Alta	24	45.4	0.33	0.73%

TABLA No. 3

Precisión Entre Ensayos (Valores en %U)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Baja	10	28.41	0.45	1.6%
Normal	10	37.1	0.65	1.8%
Alta	10	45.7	0.52	1.1%

* Medido en diez experimentos por duplicado a través de un período de diez días.

B. Exactitud (Método de Comparación)

El sistema de prueba T3-Uptake EIA fue comparado con un método T3 Uptake de radioensayo. Se utilizaron muestras biológicas con hipotiroidismo, eutiroidismo, hipertiroidismo y una población de mujeres embarazadas (los valores se encontraron entre 14 y 48%U). El número total de muestras fue de 120. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4

Método	Media (X)	Regresión cuadrada	Coefficiente de Correlación
Este Método	29.3	$y = 1.56 + 0.956(x)$	0.972
Referencia	29.0		

Únicamente ligeras cantidades de vías entre éste método y el método de referencia están indicadas por la cercanía de los valores de los mean (significativos). La mínima ecuación y la correlación del coeficiente indican un excelente método de acuerdo.

REFERENCIAS

1. Inada, M., and Sterling, K., *J. Clin. Invest.* 46, 1442. (1967)
2. Murphy, B., 1968, *Radioisotopes in Medicine, U.S. Atomic Energy Commission, Technical Information Center, Tennessee.*
3. Hollander, C.S. and Shenkman, L., *Methods of Hormone Radial Immunoassay, Academic Press, New York.* (1974)
4. Hamolsky, M.W., Stein, M. and Freedberg, S.A., *J.Clin. Endocrinol* 17,33 (1957)
5. Hebert, V., *U.S. Patent Office #3, 442, 819* (1971)
6. O'Rourke, M.E., *J. Clin. Endocrinol.* 20, 1474 (1960)
7. Roller, E., Buzzigoli, G., and Plassio, C., *J. Nucl. Med.* 13, 892 (1972)
8. Nusynowitz, M.L., and Waliszewski, *Am. J. Clin. Endocrinol* 56, 523 (1971)
9. Clark, and Horn, D.B., *Clin. Endocrinol.* 25,39

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

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