

Inserto Triiodotironina Libre (T3L) - ELISA

MONOBIND, INC.
Código de Producto: 1325-300

Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de Triiodotironina Libre por un inmuno-ensayo de enzima en suero humano o plasma en un micro plato. Los niveles de T3 Libre están hechos para reflejar la cantidad de T3 disponible en las células y pueda así determinar el status metabólico clínico de T3.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA.

Triiodotironina, una hormona tiroidea, circula en la sangre atada a las proteínas acarreadas (1,2). El transporte principal de la proteína es la tiroxina-atada globulina (TBG). De cualquier manera, solo la porción libre (desatada) de triiodotironina es la que se cree es la responsable de la acción biológica. Mas adelante, las concentraciones de las proteínas que acarrea son alteradas en varias condiciones clínicas, como el embarazo. En función tiroidea normal como las concentraciones de las proteínas alteradas acarreadas, el nivel total de triiodotironina cambia para que la concentración de triiodotironina libre permanezca constante. Así, las mediciones de las concentraciones de triiodotironina Libre correlacionan más confiabilidad con el status clínico que los niveles de triiodotironina total.

Por ejemplo, el incremento en niveles de triiodotironina total asociada con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos resulta en niveles mayores de T3 total mientras que las concentraciones de T3 Libre permanecen básicamente sin cambio.

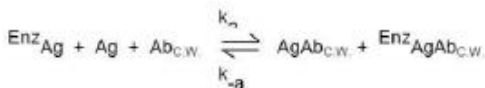
Esta metodología de inmunoanálisis de enzima en micro plato provee la técnica con sensibilidad óptima mientras se requieren pocas manipulaciones técnicas en una determinación directa de T3 Libre. En este método, el suero de referencia, el espécimen del paciente, o control es primero añadido a un pozo 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-triiodotironina 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 sustrato 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 triiodotironina Libre.

PRINCIPIO

Inmunoanálisis de Enzima Competitiva TIPO 5
(Método Análogo para la 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 albumina. 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 ecuación seguida:



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

Ag = Antígeno Nativo (Cantidad Variable)

EnzAg = Enzima-Antígeno Conjugado (Cantidad Constante)

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

$\text{EnzAgAb}_{C.W.}$ = Enzima-Antígeno Conjugado-Complejo Anticuerpo

k_a = Valor Constante de Asociación

k_{-a} = Valor Constante de Disociación

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

Después de que se logre el equilibrio, la fracción anticuerpo-límite 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

concentraciones del antígeno conocido, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEIDO

A. SUERO HUMANO DE REFERENCIA -- 1ml/vial - frascos del A-F
Seis (6) frascos de referencia del suero para la triiodotironina Libre en las concentraciones aproximadas* de 0(A), 1.0(B), 3.0(C), 5.0(D), 8.0(E) y 16.0(F) pg/ml. Almacéñese en 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.
*Niveles exactos están dados en la etiquetas en base a un lote específico.
Para Unidades SI: 1 pg/ml x 1.536 = pmol/L

B. ENZIMA CONJUGADA DE T3 TOTAL - 1.5ml/vial - icono
Cubierto con el suero de la peroxidasa horseradish (HRP) conjugada en una matriz de albúmina- estabilizada de bovino. Se ha agregado un preservativo. Almacéñese de 2-8°C

C. MICROPLACA CUBIERTA DE ANTICUERPO T3 -- 96 pozos - icono
Cubierto con el suero de oveja anti-triiodotironina y empaquetado en una bolsa de aluminio con un deshidratador. Almacéñese a 2-8°C.

D. SOLUCION LAVADORA (WASH) -- 20ml - frasco del icono
Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Se ha añadido un preservativo. Almacéñese a 2-30 °C.

ΔE. Sustrato A -- 7ml/vial - botella del icono S Un (1) bote que contiene el tetrametilbenzidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

ΔF. Sustrato B -- 7ml/vial - botella del icono S uno (1) que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacéñese a 2-8°C.

G. SOLUCIÓN PARO -- 8ml/vial - icono

Un (1) bote que contiene un ácido fuerte (1N HCl). Guárdese a 2-30°C.
I. Instrucciones del Producto.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO:

- Mida con una pipeta capaz de entregar los volúmenes 50µl con una precisión de mejor de 1.5%.
 - Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.350ml con una precisión de mejor de 1.5%.
 - Lavador de Micro placas o una botella del apretón pizeta (opcional).
 - Lector de Micro placa con capacidad de la absorbencia de la longitud de onda de los 450nm - 620nm.
 - Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la micro placa.
 - Plástico envolvente o cubierta para la micro placa para los pasos de la incubación.
 - Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
 - Contador de tiempo.
 - Materiales del control de calidad.
- Nota 1: No use 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.

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 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.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes serán sangre, suero en tipo y las precauciones generalmente en la colección de muestras de la veni-puntura deben ser observados. La sangre se debe recoger en un tubo llano del venipuntura del tapón rojo sin los añadidos o los 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. Evite congelar y deshelar. Cuando está probado en duplicado, 0.100ml del espécimen se requiere.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. WASH SOLUCION.

Diluir el contenido de la solución Wash a 1000 ml con agua destilada o desionizada en un envase conveniente. Guárdese a temperatura ambiente 20-27°C. no más de 60 días.

2. Solución Sustrato de Trabajo.

Vierta el contenido del frasco ambar etiquetado como Solución A dentro del envase limpio etiquetado como Solución B. Coloque el tapon amarillo sobre el frasco limpio para una identificación fácil. Mezcle y etiquete acordemente. Guarde a 2-8°C. **No use el sustrato de trabajo si esta se observa azul.**

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

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

- Ajuste el formato los pozos de la micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. Coloque cualquier tira que no use de los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.
- Mida con una pipeta 0.050 ml (50µl) de la referencia, del control apropiado o del espécimen en el pozo asignado.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de Solución de Reactivo Enzima-ft3 en todos los pozos.
- Remolina el micro placa suavemente por 20-30 segundos a la mezcla y cubre.
- Incube 60 minutos en la temperatura ambiente.
- Deseche el contenido del micro placa por la decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.
- Agregue 350µl del buffer lavador (véase la sección de preparación del reactivo), decántelo (golpee contra el papel absorbente) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. Puede ser utilizada una lavadora automática o manual de placas. Siga las instrucciones del fabricante para su uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón o pizeta, llene cada pozo presionando el envase (que evita burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.
- Agregue 0.100 ml (100µl) de solución activadora del sustrato 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 LA ADICION DEL SUSTRATO.

- Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
- Agregue 0.050ml (50µl) de la solución de paro a cada pozo y mézclese suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en la misma orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- Lea la absorbencia en cada pozo en los 450nm (con una referencia de longitud de onda de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del micro placa. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregada la solución de paro.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe probar controles en los niveles en la gama hipotiroidea, eu-tiroidea y del hiper-tiroidea para supervisar el funcionamiento del análisis. Estos controles se deben tratar como desconocidos y valores determinados en cada funcionamiento de procedimiento de la prueba. 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. 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.

CÁLCULO DE RESULTADOS

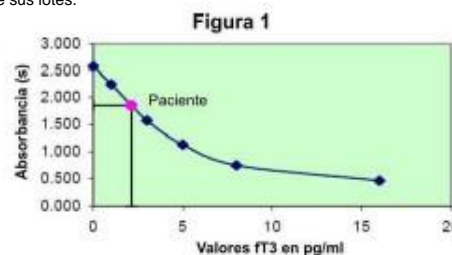
Una curva de la reacción a cierta dosis se utiliza para comprobar la concentración de Triiodotironina Libre en especímenes desconocidos.

- Registre la absorbencia obtenida del listado del lector de la micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trace la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de ft3 en pg/ml en el papel de gráfico lineal (no haga un promedio de los duplicados de las referencias del suero antes de trazar).
- Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
- Para determinar la concentración de ft3 para un desconocido, localizar la absorbencia media de los duplicados para cada uno desconocido en el eje vertical (y-axis) del gráfico, encontrar el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en pg/ml) del eje horizontal (x-axis) del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el ejemplo siguiente, la absorbencia media (1.855) (interseca la curva Standard a (2.1 pg/ml) de la concentración de ft3 (Ver Figura 1).

EJEMPLO 1

I.D. Muestra	Número de Pozo	Abs (A)	Signif. Abs (B)	Valor* (pg/ml)
Cal A	A1	2.658	2.570	8.0
	B1	2.531		
Cal B	C1	2.264	2.248	1.0
	D1	2.233		
Cal C	E1	1.570	1.578	3.0
	F1	1.585		
Cal D	G1	1.124	1.135	5.0
	H1	1.145		
Cal E	A2	0.749	0.748	8.0
	B2	0.748		
Cal F	C2	0.463	0.463	16.0
	D2	0.462		
Patient	E2	1.860	1.855	2.1
	F2	1.849		

Los datos presentados en el ejemplo 1 y el figura 1 están para ilustración solamente y no se deben utilizar en lugar de una curva de la reacción a cierta preparación de cada ensayo. Valores Asignados para calibradores son específicos de sus lotes.



PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En el orden de que los resultados del análisis sean considerados válidos los siguientes criterios deben ser conocidos:

- La absorbencia (OD) del calibrador F debe ser ≥ 1.3 .
- Cuatro fuera de seis POOL del control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. Funcionamiento del Análisis.

- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo sea constante para reproducir los resultados
- Medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
- Muestra(s), las cuales estén contaminadas microbiológicamente, no deben ser usadas en el análisis. Lipemeica alta o especímenes bernalizados que tengan similitud no deben ser usados.
- 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 falta de 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.
- Utilice los componentes del mismo lote. No mezcle reactivos de diferentes lotes.
- 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, se lee más alto que el calibrador más alto (ejemplo > 16pg/ml). No trate de diluir la muestra. Las variaciones de TBG en diferentes matrices no permiten que la hormona de T3 Libre se diluya seriamente.
 6. 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).
 7. Anticuerpos circulantes de T3 e inhibidor de la hormona-atada puede interferir (4).
 8. 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.
 9. En enfermedad severa no tiroidea (NTI), el gravámen del status del tiroides viene a ser muy difícil. Las mediciones de TSH están recomendadas para identificar la disfunción tiroidea.
 10. Condiciones familiares disalbuminémicas puede darse resultados erróneos sobre los análisis de T3 Libre(7).
- "NO INTENCIONADA PARA EL MONITOREO EN RECIEN NACIDOS."

RANGOS ESPERADOS Y VALORES

Un estudio de la población eutiroides de adulto fue emprendido para determinar los valores previstos para el sistema de la prueba del T3 Libre EIA. El valor significado (X), desviaciones estándar (σ) y los rangos previstos ($\pm 2\sigma$) se presentan en la tabla 1.

TABLA 1
Valores Esperados para el Sistema de Prueba por ELISA de T3 Libre. (En pg/ml)

	Adulto (110 especímenes)	Embarazos (75 especímenes)
Significado (X)	2.8	3.0
Desviaciones Estándar (σ)	0.7	0.6
Rangos Esperados ($\pm 2\sigma$)	1.4-4.2	1.8-4.2

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar ser encontrado por un método dado para una población de "personas -normales" 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 del rango de valores esperados establecidos por el fabricante solamente hasta que un rango interno determinado por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CARACTERISTICAS DE FUNCIONAMIENTO

A. Precisión

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de T3 Libre por ELISA Micro placa 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.

TABLA 2
Precisión Dentro Ensayo (Valores en pg/ml).

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	24	1.85	0.09	4.9%
Normal	24	4.49	0.16	3.6%
Alto	24	8.00	0.25	3.1%

TABLA 3
Precisión Entre Ensayo (Valores en pg/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	12	2.16	0.29	13.1%
Normal	12	5.09	0.40	7.9%
Alto	12	9.13	0.94	10.2%

*Como medido en 10 experimentos por duplicado.

B. Exactitud

La exactitud el sistema de la prueba del T3 Libre EIA fue comparada con un método de referencia análogo de radioinmunoanálisis. Fueron utilizados los especímenes biológicos de poblaciones hipotiroideas, eutiroides e hipertiroide (los valores se extendieron desde 0.1pg/ml – 14pg/ml). El número total de tales especímenes fue de 151. El cuadro de la última ecuación de regresión y el coeficiente de correlación fueron computados para el T3 Libre EIA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se exhiben en la tabla 4.

TABLA 4

Método	Signif (x)	Ultimo Cuadro Regresión Análisis	Correlación Coeficiente
Este Método(y)	3.05	$y = 0.35 + 0.922(x)$	0.902
Referencia(x)	2.92		

Solo una pequeña cantidad entre este método y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de regresión del último cuadro y el coeficiente de correlación indica el acuerdo excelente del método.

C. Sensitividad. El sistema de pruebas por ELISA T3 Libre tiene una sensibilidad de 0.05 pg/ml. La sensibilidad fue obtenida determinando la variabilidad de calibrador de suero 0 pg/ml y usando el 2 (95% de certeza) estadística para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad: La reactividad cruzada del anticuerpo de la triiodotironina a las sustancias seleccionadas fue evaluada agregando la sustancia que interfería a una matriz del suero en varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis del triiodotironina requerida para desplazar la misma cantidad de trazo.

Sustancia Reactividad Cruzada	Concentración
I-Triiodotironina 1.0000	-
I-Tiroxina < 0.0002	10µg/ml
Iodotirosina < 0.0001	10µg/ml
Diiodotirosina < 0.0001	10µg/ml
Diiodotironina < 0.0001	10µg/ml
Fenilbutazona < 0.0001	10µg/ml
Salicilato de Sodio < 0.0001	10µg/ml

REFERENCIAS

1. Pederson KO, *Scand J Clin Lab Invest*, **34**, 247 (1974).
2. Wild D, *Immunoassay Handbook*, Stockton Press, 330 (1984).
3. Wenzel KW, *Metabolism*, **30**, 717 (1981).
4. Bhagat C, et al, *Clin Chem*, **29**, 1324 (1983).
5. Lundberg PR, et al, *Clin Chem*, **28**, 1241 (1982).
6. Melmed S, et al, *J Clin Endocrinol Metab*, **54**, 300 (1982).
7. Lalloz MR et al, *Clin Endocrinol*, **18**, 11 (1983).

