

Immunoassay





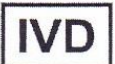




REF E1001

96 tests/192 tests

T3 ELISA

microplate based ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) for the quantitative determination of T3 (triiodothyronine) in human serum

All trademarks are properties of their respective owners.

Key to Graphical Symbols Used			
	batch code		use by
	manufacturer		contains sufficient for <n> tests
	<i>in vitro</i> diagnostic medical device		temperature limitation
	catalogue number		consult instructions for use
	authorized representative in the European Community		

IVD

T3

Introducción

La glándula tiroidea humana es un componente importante del sistema endocrino. Las hormonas tiroideas realizan muchas funciones importantes. Ellas ejercen poderosas y esenciales influencias regulatorias en el crecimiento, diferenciación, metabolismo celular y en el balance general de las hormonas del cuerpo, también como en el mantenimiento de las actividades metabólicas y en el desarrollo del esqueleto y el sistema de órganos¹.

Las hormonas T4 (tiroxina) y T3 (3, 5, 3'-triyodotironina) circulan en la corriente sanguínea, en su mayor parte unida a la proteína plasmática, la TBG (globulina unida a la tiroxina)^{2,3}. La concentración de T3 es mucho menor que la de T4, pero su potencia metabólica es mucho más grande.

La determinación de T3 es un factor importante en el diagnóstico de enfermedades tiroideas⁴. Su medida ha descubierto una variante de hipertiroidismo en pacientes con tirotoxicosis con elevados niveles de T3 y niveles normales de T4. Un incremento de T3 sin incremento de T4 es frecuentemente un predecesor de tirotoxicosis recurrente en pacientes previamente tratados. La significancia clínica del T3 es también evidente en pacientes en los cuales el eutiroidismo es atribuible solamente al T3 normal, aunque sus valores de T4 sean subnormales.

La determinación de T3 es también útil en el monitoreo tanto de pacientes bajo tratamiento de hipertiroidismo como de los que han discontinuado la terapia con fármacos anti-tiroidea. Es especialmente valioso distinguir entre sujetos eutiroides e hipertiroides.

En adición al hipertiroidismo, los niveles de T3 elevados en mujeres embarazadas y en mujeres tomando contraceptivos orales o en tratamiento con estrógeno, el TBG incrementa paralelamente de forma análoga a los niveles de T4. De la misma forma, una reducción de TBG reduce la concentración de T3. Estos cambios en los niveles de T3, sin embargo, no son un verdadero reflejo del estatus tiroideo.

Principios de Medida

Este ensayo está basado en el método competitivo de un paso. La muestra, micropocillos recubiertos de derivado T3 y el Anti-T3 marcado como enzima son combinados. Durante la incubación, el derivado T3 recubierto en micropocillos y el T3 presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados como enzima. Después del lavado, un complejo es generado entre la fase sólida y los anticuerpos ligados a la enzima por reacciones inmunológicas. Las Soluciones de Substrato son entonces añadidas y catalizadas por este complejo, resultando una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbencia. La intensidad del color es inversamente proporcional al monto de T3 en la muestra.

Componentes

1. Calibrador A/B/C/D/E/F.

6 viales conteniendo 1 ml de calibrador desde A hasta F con las concentraciones de T3 correspondientes mostradas en la siguiente tabla. La matrix es suero humano conteniendo PBS (buffer de fosfato salino). Contiene una selección de preservativos.

Calibrador	Concentración de T3 (pmol/l)
A	0
B	0.5
C	1
D	2.5
E	5
F	10

Para unidades SI: 1 ng/l x 1.536 = 1 nmol/l

2. Pocillos recubiertos.

1 placa (96 pruebas) o 2 placas (192 pruebas) de 96 pocillos pre-recubiertos con derivado T3.

3. Concentrado de Enzima Conjugada.

1 vial conteniendo 1.2 ml (96 pruebas) o 1.6 ml (192 pruebas) del Anti-T3 monoclonal de oveja marcado HRP (*horseradish peroxidase*) 20 veces fuerza de trabajo en buffer Tris-NaCl conteniendo BSA (albumina de suero bovino). Contiene 0.2% de preservativo ProClin 300®.

4. Diluyente de Enzima Conjugada.

2 viales cada uno conteniendo 7.5 ml (96 pruebas) o 15 ml (192 pruebas) de buffer Tris-NaCl conteniendo ANS. Contiene 0.2% de preservativo ProClin 300®.

5. Solución de parada.

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (192 pruebas) cada uno conteniendo 7.5 ml de 1 mol/l de ácido sulfúrico.

6. Solución de Substrato.

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (192 pruebas) cada uno conteniendo 12 ml de una mezcla compuesta de buffer TMB y peróxido de hidrógeno.

7. Concentrado de Solución de Lavado.

1 vial conteniendo 25 ml de la solución de lavado PBS-Tween 40 veces fuerza de trabajo.

8. 1 copia de las instrucciones de uso.

9. 2 piezas (96 pruebas) o 4 piezas (192 pruebas) de tapas de placa.

10. 1 bolsa Zip-lock.

Trazabilidad Metrológica de los Calibradores

Los calibradores del producto son fabricados utilizando T3 de puro grado y la señal emparejada para funcionar con nuestros calibradores de trabajo, los cuales también son emparejados con un calibrador secundario adquirido del NICPBP (Instituto Nacional para el Control de Productos Farmacéuticos y Biológicos; *National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products*, por sus siglas en inglés), China, a cada nivel de concentración.

Materiales Requeridos pero no Suministrados

1. Papel absorbente o papel toalla.
2. Lavadora de bandas de microplacas automática.
3. Canales de Reactivos Desechables.
4. Agua destilada.
5. Incubadora.
6. Agitador magnético.
7. Micropipetas y micropipetas multicanal de volúmenes apropiados.
8. Lector de microplaca.
9. Agitador de placas.
10. Mezclador de vórtice.

Advertencias y Precauciones

1. Para uso profesional solamente.
2. Seguir las instrucciones de uso cuidadosamente. La confiabilidad de los resultados no pueden ser garantizados si hay alguna desviación de las instrucciones en este inserto.
3. Referirse a la hoja de datos de seguridad del material y a la etiqueta del producto para cualquier riesgo químico que pueda presentarse en este ensayo.
4. Manejar los materiales potencialmente contaminados de forma segura de acuerdo al requerimiento local.
5. PRECAUCIÓN: Los calibradores contienen componentes de origen humano, las cuales han sido probadas y encontradas no reactivas para anticuerpos VIH 1 y VIH 2: Anticuerpos HCV y HBsAg por los reactivos IVD marcados CE. Se recomienda que todo material de fuentes humanas sea considerado potencialmente infeccioso. Este ensayo contiene materiales de origen animal. Componentes bovinos originados en países donde el BSE no ha sido reportado.
6. No fumar, beber, comer o usar cosméticos en el área de trabajo.
7. Vestir ropa de protección y guantes desechables cuando se trate con muestras y reactivos. Lavar las manos después de la operación.
8. Tenga cuidado cuando maneje muestras de pacientes para prevenir contaminaciones cruzadas. Se recomienda la utilización de pipetas desechables o puntas de pipetas.
9. Mezclar la muestra en los pocillos por completo agitando y eliminando las burbujas.
10. Realizar el ensayo lejos de condiciones de mal ambiente, por ejemplo, ambientes donde el aire contiene alta concentraciones de gas corrosivo tales como el ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído y etc., o conteniendo polvo.
11. Lavar los pocillos completamente. Cada pocillo debe ser enteramente inyectado con solución de lavado. La fuerza de la inyección, sin embargo, no está supuesta a ser demasiado intensa para evitar inundación. En cada ciclo de lavado, secar

los líquidos en cada pocillo. Sumergir la microplaca en el papel absorbente para remover gotitas de agua residuales. Se recomienda lavar la microplaca con una lavadora de bandas de microplacas automática.

12. Un fallo al remover la solución adherente adecuadamente en los pasos de lavado para la aspiración o la decantación puede resultar en una pobre replicación y en falsos resultados.
13. No toque o riegue el borde de los pocillos con conjugado. No soplar las micropipetas.
14. No utilizar reactivos más allá de la fecha de expiración.
15. No mezclar o usar componentes de kits con diferentes códigos de lote.
16. No utilizar más de 32 pocillos para cada ejecución del ensayo, cuando la pipeta manual es utilizada, completar el pipeteo de todos los calibradores, muestras y controles de veracidad en 5 minutos. Si una pipeta automatizada está disponible, utilizar una placa completa de 96 pocillos.
17. Si más de una placa es usada, es recomendable repetir la curva de calibración.
18. Cuando se almacenen los calibradores, asegúrese de que cada vial esté sellado de forma segura.
19. Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo sea mantenido constante para lograr resultados reproducibles.
20. Es importante calibrar todo el equipo, por ejemplo, micropipetas, lectores de microplacas, lavadoras de bandas de microplacas automáticas, y/o los instrumentos automáticos usados con este dispositivo, y realizar mantenimiento preventivo de rutina.
21. Asegurar que el fondo de la placa esté limpio y seco y que no haya burbujas presentes en la superficie del líquido antes de la lectura de la placa.
22. La adición de solución de substrato inicia una reacción cinética, la cual es terminada con la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el substrato y la solución de parada deben ser añadidas en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación durante la reacción.
23. Cuando se diluye el concentrado de enzima conjugada en el diluyente de enzima conjugada, el conjugado obtenido es estable a 4°C por 7 días. Recomendamos que la cantidad del concentrado de enzima conjugada diluido dependa del tamaño de su ensayo
24. Es esencial un preciso y exacto pipeteo, así como seguir el tiempo exacto y los requerimientos de temperatura prescritos.

Almacenaje

1. Almacenar todos los componentes a 2-8°C. No congelar. Evitar luz fuerte.
2. Colocar los pocillos sin usar en la bolsa *Zip-lock* con el desecante suministrado, entonces selle la bolsa *Zip-lock* en el estuche de papel de aluminio con la tapa de una placa y regrese a 2-8°C, condiciones bajo las cuales los pocillos permanecerán estables por 2 meses, o hasta la fecha de expiración etiquetada, lo que suceda primero.
3. Sellar y regresar todos los calibradores sin usar a 2-8°C, condiciones bajo las cuales la estabilidad será mantenida por 1 mes, para un uso más largo, guardar los calibradores abiertos en alícuotas y congelar a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento.

- Sellar y regresar todos los demás reactivos sin usar a 2-8°C, condiciones bajo las cuales la estabilidad será mantenida por 2 meses o hasta la fecha de expiración etiquetada, lo que suceda primero.

Muestra

- Colectar muestras de acuerdo las correctas prácticas médicas.
- No utilizar muestras inactivadas por calor. No utilizar preservativos de azida de sodio en las muestras.
- Sedimentos y sólidos suspendidos en muestras puede interferir con los resultados de las pruebas los cuales deben ser removidos por centrifugación. Asegurar que la completa formación de coágulo en las muestras de suero haya tomado lugar previo a la centrifugación. Algunas muestras, especialmente aquellas de pacientes recibiendo anticoagulantes o terapia trombolítica, pueden exhibir tiempo de coagulación incrementado. Si la muestra es centrifugada antes de completar formas de coágulo, la presencia de fibrina puede provocar resultados erróneos. Asegúrese que las muestras no hayan decaído previo a su uso.
- Anteriormente al envío, se recomienda que las muestras sean removidas del coágulo, separador de suero o glóbulos rojos.
- Un procesamiento de muestra insuficiente, o la interrupción de la muestra durante la transportación puede provocar resultados deprimidos.
- Evitar muestras extremadamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
- Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas, las muestras de uso a largo plazo deben ser tapadas y almacenadas a 2-8°C hasta 48 horas. O congele las muestras que necesiten ser almacenadas o transportadas por más de 48 horas a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento. Mezcle las muestras descongeladas completamente por vórtice a baja velocidad o invirtiendo 10 veces. Inspeccionar visualmente las muestras, observar si hay estratificación o capas, continúe mezclando hasta que las muestras sean visiblemente homogéneas. Después de descongelar, traiga a temperatura ambiente y mezcle bien agitando gentilmente.
- Centrifugar las muestras descongeladas conteniendo glóbulos rojos o partículas, o que sean difusas o nubosas en apariencia previa a su uso para asegurar consistencia en los resultados.
- Notar que niveles interferentes de fibrina podrían estar presentes en muestras que no tienen partícula obvia o visible.
- Si la propia colecta y preparación de muestras no puede ser verificada, o si las muestras han sido interrumpidas debido a la transportación o en su manejo, se recomienda un paso adicional de centrifugación. Las condiciones de centrifugación deberían ser suficientes para remover partículas.

Preparación de reactivo

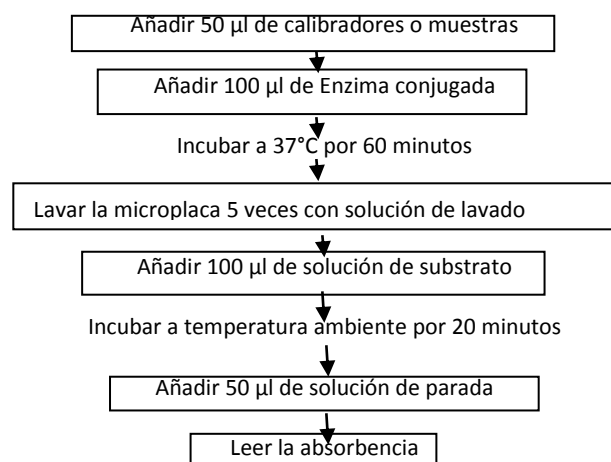
- Traer todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) previo a su uso por al menos 30 minutos. Mezcle todos los reactivos invirtiendo gentilmente previo a su uso. No inducir espuma.

- Ajustar la incubadora a 37°C.
- Añadir 1 volumen de concentrado de Enzima conjugada a 19 volúmenes de diluyente de enzima conjugada y mezclar bien. La cantidad de conjugado diluido dependerá del tamaño de su ensayo.
- Añadir 1 volumen de concentrado de solución de lavado a 39 volúmenes de agua destilada para dar el volumen requerido, y mezclar bien con un agitador magnético. La solución de lavado es estable a temperatura ambiente por dos meses.

Procedimiento de Medida

- Usar sólo el número de pocillos requeridos y formatear los pocillos de microplacas para cada calibrador y muestra a ser probada.
- Añadir 50 µl de calibradores o muestras a cada pocillo.
- Añadir 100 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
- Agitar en un agitador de placa por 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pocillos.
- Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37°C por 60 minutos.
- Desechar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si es con decantación, tapar y secar la placa seca con papel absorbente.
- Añadir 350 µl de solución de lavado, decante (tape y seque) o aspire. Repetir 4 veces más para un total de 5 lavados. Una lavadora de bandas de microplacas automática puede ser utilizada. Al final del lavado, invertir la placa y remover cualquier solución de lavado residual en el papel absorbente.
- Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada fuente.
- Incubar a temperatura ambiente en la obscuridad y permitir la reacción por 20 minutos.
- Añadir 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
- Agitar en el agitador de placa por 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse que el color azul cambie completamente a amarillo.
- Dentro de los 15 minutos lea la absorbencia de cada pocillo a 450nm utilizando 620 a 630nm como longitud de onda referente en caso de estar disponible.

Esquema de Flujo Procedimental



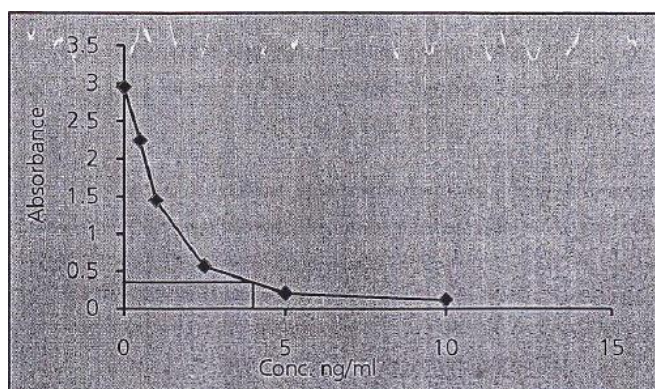
Resultados de la Medida

1. Registre la absorbencia obtenida de la impresión del lector de microplaca como explica el Ejemplo 1. Calcular el promedio de absorbencia de cualquier duplicado de medidas y use el promedio para el siguiente cálculo.
2. Trace la absorbencia contra la concentración en 1ng/ml para cada calibrador.
3. Dibuje la curva punto por punto a través de los puntos trazados en el papel de gráfico lineal. Si una computadora es utilizada, seleccionar punto por punto la función del método de reducción de data de ajuste de curva para generar una curva de calibración.
4. Para determinar la concentración de T3 para un desconocido, localizar la absorbencia para cada desconocido en el axis vertical (y-axis) del gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva, y lea la concentración (en ng/ml) desde el axis horizontal (x-axis) del gráfico. Si una computadora es utilizada, para determinar la concentración de T3 para un desconocido, ingresar la absorbencia para cada desconocido y obtener la concentración (en ng/ml). En el siguiente ejemplo, la absorbencia 0.352 interseca la curva de calibración a la concentración de T3 a 4ng/ml. (Ver figura 1)

Ejemplo 1

Muestra	Absorbencia	Valor (ng/ml)
Cal A	2.958	0
Cal B	2.244	0.5
Cal C	1.449	1
Cal D	0.568	2.5
Cal E	0.208	5
Cal F	0.118	10
Ctrl 1	0.931	1.88
Ctrl 2	0.302	4.35
Muestra	0.352	4

Figura 1



Nota: El dato presentado en el Ejemplo 1 y la Figura 1 son sólo para ilustración y no debe ser usado en lugar de la curva de calibración preparada con cada ensayo. Ctrl 1 y Ctrl 2 no están incluidos en el kit y pueden ser obtenidos de forma separada.

Procedimiento de Control

El requerimiento de control recomendado para este ensayo es comprar los materiales de control separadamente y probarlos juntos con las muestras dentro de la misma ejecución. El resultado

es válido si los valores de control caen dentro de los rangos de concentración impresos en las etiquetas.

Limitaciones del Procedimiento

1. La intención de esta prueba es una ayuda para el diagnóstico clínico. Conducir este ensayo en conjunto con el examen clínico, la historia médica del paciente y otros resultados.
2. Si los resultados son inconsistentes con la evidencia clínica, se sugiere una prueba adicional para confirmar el resultado.
3. Anticuerpos heterofílicos y factores reumatoides en muestras interfieren con los resultados. Anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden reaccionar con inmunoglobulinas de reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos *in vitro*. Los pacientes rutinariamente expuestos a animales o a productos de suero animal pueden tender a esta interferencia y valores incongruentes podrían ser observados. Información adicional podría ser requerida para el diagnóstico. Esta clase de muestras no son adecuadas para ser probadas por este ensayo.
4. El rendimiento de esta prueba no ha sido establecido con muestras neonatales.
5. La concentración de T3 en el suero es dependiente de múltiples factores: función de la glándula del hipotálamo y su regulación, concentración de TBG, y la unión del T3 al TBG. Así, la concentración de T3 por sí sola no es suficiente para evaluar un estatus clínico.
6. Se ha encontrado un descenso en los valores de T3 con enfermedades de pérdida de proteínas, ciertas enfermedades del hígado y la administración de testosterona, difenilhidantoina o salicilatos. Una lista con las drogas y condiciones interfirientes que afectan los valores de T3 total ha sido compilada por la Journal of the American Association of Clinical Chemists (Revista de la Asociación Americana de Químicos Clínicos)².

Intervalo de Referencia Biológica

Un rango normal de 0.8 ng/ml a 2.1 ng/ml (99% intervalo de confianza) fue obtenido probando muestras de suero de 617 individuos definidos como normales por médicos clínicos. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango normal el cual puede ser único para la población que sirve dependiendo de factores geográficos, de pacientes, de dietas o ambientales.

Características de Rendimiento

1. Precisión de Medida

Este ensayo está diseñado para tener una precisión intraserial de < 10%. 2 plasmas humanos agrupados basados en miembros de panel (1 y 2) fueron examinados, usando 1 lote de reactivos, en replicas de 20. La data de este estudio está resumida en la siguiente tabla:

Miembro de panel	Lote	n	Promedio	SD Intraserial	Precisión %CV
1	1	20	1.76	0.04	2.25
2	1	20	3.96	0.12	3.1

Este ensayo está diseñado para tener una precisión interserial de < 15%. 2 plasmas humanos agrupados basados en miembros de panel (1 y 2) fueron examinados, usando 2 lotes de reactivos en réplicas de 2, una vez por día a través 20 días de prueba. La data de este estudio está resumida en la siguiente tabla:

Miembro de panel	Lote	n	Promedio	SD Inter-serial	Precisión %CV
1	1	40	1.05	0.09	8.57
2	1	40	1.95	0.07	3.58

2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se define como la concentración correspondiente al promedio de absorbencia de 20 réplicas de calibrador A menos 2 desviaciones estándar, es ≤ 0.2 ng/ml.

3. Especificidad analítica

Este ensayo está diseñado para tener una especificidad analítica de menos de 0.5% de reactividad cruzada con las sustancias mencionadas más abajo, en los niveles de concentración mencionados a su vez, en suero humano libre de hormonas.

Interfiriente	Concentración (ng/ml)	Valor medido (ng/ml)	Reactividad cruzada (%)
T4	500	1.44	0.29
rT3	500	0.24	0.05

4. Precisión de medida por correlación.

Se realizó un estudio de comparación donde las muestras fueron probadas utilizando este ensayo y una prueba T3 basada en micropartícula, la cual había sido ya marcada CE. La data fue analizada y está resumida en la siguiente tabla:

Método de correlación	Número de muestras	Intercepción	Inclinación	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	210	0.1551	1.018	0.963

Literatura de referencia

1. Chopra IJ, Ho RS, Lam R. An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum: its application to clinical and physiological studies. I. Lab. Clin. Med. 1972;80(5):729-139.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory tests. Ann. Clin. Biochem. 1997;34 (Pt6):579-581 .
3. Santini F, Pinchera A, Ceccarini G, et al. Evidence for a role of the type III-iodothyronine deiodinase in the regulation of 3,5,3'-trriiodothyronine content in the human central nervous system. Eur. J Endocrinol. 2001 ;144(6):571-583.
4. Nikkilá EA, Kekki M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease.,i. Clin Invest. 197 2;51(B):2103-2114.