



## T3 ELISA KIT

# Inmunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de triyodotironina (T3) en suero humano

### USO

Para la medición cuantitativa de la triyodotironina (T3) en suero humano.

### INTRODUCCION

La glándula tiroides humana es el componente principal del sistema endocrino. Las hormonas tiroideas desempeñan muchas funciones importantes. Ejercen ponderosas y esenciales influencias regulatorias en el crecimiento, diferenciación, metabolismo celular, y el balance general hormonal del cuerpo, así como el mantenimiento de la actividad metabólica y el desarrollo del sistema esquelético y de órganos.

Las hormonas tiroxina (T4) y 3,5,3' triyodotironina (T3) circulan en el torrente sanguíneo, mayormente unida a la proteína del plasma, globulina fijadora de tiroxina (TBG). La

concentración de T3 es mucho menor que de T4, pero su potencia metabólica es mucho mayor.

Determinaciones de T3 son un importante factor en el diagnóstico de padecimientos de tiroides. Su medición ha descubierto una variante de hipertiroidismo en pacientes con valores de T3 elevados y T4 normales. Un aumento en T3 sin un aumento en T4 es frecuentemente un precursor de tirotoxicosis recurrente en pacientes previamente tratados. La significancia clínica de T3 es también evidente en pacientes en los que el eutiroidismo es atribuible solo a T3 normal, aunque sus valores de T4 son subnormales.

La determinación de T3 es también útil de seguimiento tanto de pacientes bajo tratamiento por hipertiroidismo como de pacientes que han discontinuado la medicación contra la tiroides. Esta es especialmente valorada en distinción entre eutiroides e hipertiroideos.

Además del hipertiroidismo, los niveles de T3 son elevados en mujeres en estado de embarazo, y en mujeres que toman anticonceptivos orales o tratamientos con estrógeno, paralelamente la TBG se incrementa en una manera análoga a niveles de T4.

Del mismo modo, una reducción en concentraciones de TBG disminuye concentraciones de T3.

Esto cambia en el nivel de T3, sin embargo, no hay un reflejo real del estatus de la tiroides.

### PRINCIPIOS DE LA PRUEBA

En el T3 EIA, una cierta cantidad de T<sub>3</sub> análoga es revestida en pocillos de microtitulación. Una cantidad moderada de suero del paciente, y una cantidad constante de anticuerpos anti-T3 conjugados con peroxidasa de rábano se añaden a los pocillos de microtitulación. 8 anilino-1-naptaleno-sulfonato (ANS) es usado para desplazar T3 desde proteínas para permitir la medición total de T3 circulante.

Los reactivos se incuban a una temperatura de 37°C. Durante la incubación T3 en pocillos de microtitulación y T3 presente en la muestra, el estándar compete por unir el anti-T3 conjugado con peroxidasa de anticuerpos monoclonales de rábano. Después de 60 minutos de incubación a 37°, los pocillos son lavados 5 veces por el buffer de lavado para remover consolidados anti-T3-anticuerpo conjugado.

Se añaden solución de sustrato y solución de cromógeno y se incuban durante 20 minutos, resultando un color azul. El desarrollo del color es detenido con al agregar la solución, y se mide la absorbancia espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional, dentro del rango de trabajo del ensayo, a la concentración de T3 en la muestra. La concentración de T3 en la muestra de pacientes o control es entonces determinado por interpolación de la curva estándar.

## Almacenamiento del kit de prueba e instrumentación.

1. El kit de pruebas sin abrir debe ser almacenado a 2-8°C una vez recibido y las placas de microtitulación deben mantenerse en una bolsa sellada con desecante para minimizar la exposición a la contaminación ambiental. El kit debe usarse a lo largo de la fecha de vencimiento del kit. Se hace referencia de la fecha de expiración en a etiqueta del envase.
2. Kits de prueba abiertos son estables hasta la fecha de expiración mostrada, siempre y cuando se almacena como prescribe anteriormente.
3. El uso un lector de placas de microtitulación con un ancho de banda de 10nm o menos, y un rango de densidad óptica de 0-2 OD superior a 450 nm de longitud de onda es aceptable en la medición de absorbancia.

## Recogida y preparación de la muestra

1. La sangre debe extraerse usando utilizando técnicas estándares de punción venosa y el suero de separarse de las células rojas de la sangre tan pronto como sea posible. Evite hemolítica excesiva, muestras lipémicas o turbias.
2. Muestras de plasma colectada en tubos conteniendo EDTA, heparina o oxalato pueden interferir con la el procedimiento de la prueba y deben evitarse.

3. Las muestras deben cubrirse y almacenarse hasta 48 horas a 2-8°C, antes del ensayo. Muestras almacenadas para un largo tiempo deben congelarse a -20. Las muestras deben descongelarse antes de utilizarse.

## Materiales y componentes

### Materiales proporcionados con el kit de pruebas

1. T3 análogo-recubierto pocillos de microtitulación, 96 pruebas.
2. T3-Conjugado Concentrado (20x,1 vial, 1.2ml)
3. T3-Conjugado Diluyente, (2 viales, 7.5 ml /ec)
4. Norma de referencia, 1 set. Contiene 0, 0.5, 2.5, 5.0 and 10.0 ng/ml. Listo para usar.
5. Solución de sustrato A, Tetrametilbenzidina, (7.5 ml, 1 vial)
6. Solución de sustrato B, Peróxido de Hidrógeno (7.5ml, 1 vial)
7. Solución de Stop, (7.5 ml, 1 vial)
8. Lavador de buffer concentrado, PBS-Tween, 25ml (40X).

### Materiales requeridos pero no suministrados

1. Agua destilada
2. Pipetas de precisión: 0.05ml,0.1ml,0.2ml
3. Tips de pipetas desechables.
4. Lector de Micropipetas.

5. Mezclador Vortex ó equivalente.
6. Papel Absorbente
7. Papel Gráfico.

## Preparación del reactivo

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de usarlos.
2. Para preparar el reactivo T3-HRPO anticuerpo conjugado, añada 0.1 ml de concentrado de conjugado T3-HRPO a 2.0 ml de diluyente de conjugado T3 (dilución 1:20), y mezclar bien. La cantidad de conjugado diluido es dependiendo del tamaño de ensayo. El reactivo conjugado es estable a 4°C por lo menos durante 7 días.
3. Para preparar el buffer de lavado: añadir 1ml de la concentración de lavado a 39ml de agua destilada y mezclar bien. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente al menos durante una semana.
4. **Conservar a 2-8°C hasta la fecha de expiración indicada en la etiqueta del vial Una vez abierto, el reactivo es estable por 2 meses y puede ser congelado a -20°C para un almacenamiento a largo plazo.**

## Procedimiento del ensayo

1. Asegure el número deseado de pocillos recubiertos en el holder. Hacer hoja de datos con identificación de la muestra.

2. Dispense 50ul del estándar, muestras, y controles en los pocillos apropiados.
  3. Mezcle todo durante 10 segundos, luego vierta 100ul de la enzima conjugada en cada pocillo.
  4. Mezclar bien por 30 segundos. Es importante tener una mezcla completa en este paso.
  5. Incubar a 37°C por 60 minutos.
  6. Retire la mezcla de incubación accionando contenido de la placa en un recipiente de residuos.
  7. Enjuague y de los pocillos de microtitulación 5 veces con el buffer de lavado.
  8. Agite los pocillos fuertemente en papel absorbente para remover gotas residuales de agua.
  9. Dispense 50 ul de Solución en cada pocillo. Mezcle suavemente por 5 segundos.
  10. Dispense 50ul de solución cromógena en cada pocillo. Mezcle suavemente por 5 segundos.
  11. Incube a una temperatura ambiente en la oscuridad por 20 minutos sin agitar.
  12. Detenga la reacción agregando 50ul de solución de Stop en cada pocillo.
  13. Mezcle suavemente por 15 segundos.
- **Es muy importante asegurarse que el color azul cambia a color Amarillo completamente.**
    14. Lea OD a 450nm con un lector de microtítulos dentro de 15 minutos.

### Cálculo de los resultados

1. Calcule los valores de absorbancia promedio (A450) para cada conjunto de estándar de referencia, controles y muestras.
2. Se recomienda utilizar un software adecuado para calcular los resultados. Si el software no está disponible, construya la curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada una norma de referencia contra su concentración en ng/ml en un papel gráfico lineal, con la absorbancia en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (x).
3. Usando el valor medio de la absorbancia para cada muestra, determine la concentración correspondiente de T3 en ng/ml desde la curva estándar.

### Ejemplo de la curva estándar

1. Resultados de la un estándar típico se muestra a continuación:

| T3(ng/ml) | O.D 450 nm |
|-----------|------------|
| 0.0       | 2.91       |
| 0.5       | 1.972      |
| 1.0       | 1.347      |
| 2.5       | 0.671      |
| 5.0       | 0.225      |
| 10.0      | 0.085      |

2. Curva estándar:

Nota: esta curva estándar es solo para un propósito de ilustración, y no debe ser utilizada para calcular incógnitas.

Cada laboratorio debe proveer su propia información y curva estándar.

### Valores esperados y sensibilidad:

Rango normal: 8.0 ~1.90ng/ml

La concentración mínima detectable de T3 en este ensayo se estima en 0.2 ng / ml.

### Limitaciones:

Como con todos los inmunoensayos, los resultados de esta prueba puede ser influenciada por factores presentes en algunos especímenes de pacientes.

Los reactivos para esta prueba han sido formulados para minimizar la interferencia de anticuerpos heterófilos y de la proteína de unión no específica. Sin embargo, pruebas individuales pueden verse afectadas.

Para el diagnóstico, los resultados obtenidos con esta prueba deben siempre ser usados en combinación con utilizar siempre en combinación con examen clínico, la historia médica del paciente, y otros hallazgos.

Las instrucciones del procedimiento deben seguirse exactamente. Cualquier modificación del procedimiento puede cambiar los resultados.

El uso de reactivos, material desechable o piezas de recambio que no sean los suministrados por un

distribuidor autorizado puede producir resultados incorrectos.

Los pacientes que han recibido anticuerpos monoclonales de ratón, ya sea para diagnóstico o terapia pueden desarrollar anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA). HAMA puede producir valores falsos ya sea alto o bajo en inmunoensayos que utilizan anticuerpos monoclonales. Las muestras que contienen HAMA no deben ser analizadas con la prueba de T3 total.

### Referencias

1. Walker W.H.C Introduction: An Approach to Immunoassay. **Clin. Chem.** 1977., 23:384
2. Kirkegaard C., Friis T and Siersback-Nielsen K. **Acta Endocrinol.** 1974., 77:71
3. Wisdom G.B Enzyme –Immunoassay. **Clin. Chem..** 1976., 22:1243

Atlas Medical

Unit 4, William James House

Cowley Rd, Cambridge, CB4 0WX

Tel: +44(0) 1223 858 910

Fax: +44(0) 1223 858 524

PPI603A01

Revision B (25.09.2010)