

Immunoassay









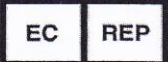
REF E1004

96 tests/192 tests

FT3 ELISA

microplate based ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) for the quantitative determination of FT3 (free 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

FT3

Introducción

Los niveles de FT3 (triyodotironina libre) no son los indicadores más precisos de la función tiroide y poseen una limitada aplicabilidad. Las medidas de FT3, como las de FT4 (tiroxina libre), miden la hormona que no está atada a las proteínas de unión tales como el TBG. Las medidas de hormonas libres son difíciles ya que las concentraciones medidas son muy pequeñas – de hecho, las medidas actualmente estimulan los niveles libres más que medirlos directamente. Comparado con el FT4 y TSH (tirotropina), la concentración de FT3 no es frecuentemente determinada. Primero su concentración permanece normal hasta que el hipertiroidismo es severo, y el FT3 es restringido a un diagnóstico particular donde el hipertiroidismo necesita ser confirmado, finalmente, las determinaciones de FT3 son frecuentemente restringidas a departamentos especializados¹. El T3 (triyodotironina) circula en la sangre casi completamente unida (>99.5%) a los portadores de proteínas. Además, las concentraciones de las proteínas portadoras son alteradas en muchas condiciones clínicas, tales como el embarazo. Para estudios clínicos de los efectos de las proteínas, el FT3 es independiente de la concentración de proteína en el suero para las proteínas de unión del TBG y TBPA². En la función normal tiroide, mientras la concentración de las proteínas portadoras se altera, el nivel total de T3 cambia para que la concentración de FT3 permanezca constante³. Así, las medidas de concentraciones de FT3 correlacionan de forma más estable con el estado clínico que el total de los niveles de T3. Por ejemplo, el incremento en el total de los niveles de T3 asociados con el embarazo, los contraceptivos orales y las terapias de estrógeno resultan en altos niveles del total de T3 mientras la concentración de FT3 permanece básicamente sin cambiar⁴. En adición, se ha encontrado que el promedio del valor de FT3 posee una gradiente descendente de joven a viejo⁵.

Principios de Medida

Este ensayo está basado en el método competitivo de un paso. La muestra, el derivante T3 recubierto sobre micropocillos y el Anti-T3 marcado con enzima son combinados. Durante la incubación, el derivante T3 revestido sobre microplacas y el FT3 presente en la muestra compiten por unirse a los anticuerpos marcados con 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 en una reacción cromogénica. La reacción cromogénica resultante se mide como absorbencia. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de FT3 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 FT3 correspondientes mostradas en la siguiente tabla. La matriz es suero humano conteniendo PBS (buffer de fosfato salino). Contiene una selección de preservativos.

| Calibrador | Concentración de FT3 (pmol/l) |
|------------|-------------------------------|
| A | 0 |
| B | 2 |
| C | 5 |
| D | 10 |
| E | 25 |
| F | 50 |

Para unidades SI: 1 pmol/l x 0.651 = 1pg/ml

2. Placas revestidas.

1 lámina (96 pruebas) o 2 placas (192 pruebas) de 96 placas pre-revestidas con derivante T3.

3. Enzima conjugada.

1 vial (96 pruebas) o 2 viales (192 pruebas) conteniendo 11 ml de HRP (*horseradish peroxidase*) marcados Anti-T3 monoclonal de oveja en buffer Tris-NaCl conteniendo BSA (albumina de suero bovino). Contiene 0.2% de preservativo ProClin 300®.

4. 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.

5. 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.

6. Solución de lavado concentrado.

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

7. 1 copia de las instrucciones de uso.

8. 2 piezas (96 pruebas) o 4 piezas (192 pruebas) de tapas de placa.

9. 1 bolsa Zip-lock.

Trazabilidad metrológica de los calibradores.

Los calibradores del producto funcionan con un calibrador de trabajo. Este calibrador de trabajo es fabricado por métodos gravimétricos a través de la adición de antígeno T3 a un suero humano libre de hormonas.

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. Solo para uso profesional.
2. Seguir las instrucciones de uso cuidadosamente. La confiabilidad de los resultados de del ensayo no pueden ser garantizados si hay alguna desviación de las instrucciones en el prospecto.
3. Referirse a la hoja de datos de seguridad del material y a la etiqueta del producto para cualquier riesgo químico que pueda estar presente en este ensayo.
4. Manejar los materiales potencialmente contaminados de forma segura de acuerdo al requerimiento local.
5. PRECAUCIÓN: Los calibradores contienen componentes de fuentes humanas, los cuales han sido probados y encontrados no reactivos para VIH 1 y anticuerpos VIH 2, los anticuerpos HCV y HBsAg por los reactivos IVD marcados por CE. Es recomendado que todo material de fuentes humanas sea considerado potencialmente infeccioso. Este ensayo contiene materiales de origen animal. Componentes bovinos originados en países donde 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. Lavarse las manos después de la operación.
8. Tenga cuidado cuando maneje muestras de pacientes para prevenir contaminaciones cruzadas. La utilización de pipetas desechables o puntas de pipetas es recomendada.
9. Mezclar la muestra en los pocillos profundamente agitando y eliminando las burbujas.
10. Realizar el ensayo lejos de las condiciones de mal ambiente, por ejemplo, ambientes donde el aire contiene altas concentraciones de gas corrosivo tales como el ácido hipoclorito de sodio, alcalino, acetaldehído y así, 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 residual. Se recomienda lavar la microplaca con una lavadora de bandas de microplacas automática.
12. Un fallo al remover la solución adherente adecuadamente en la aspiración o la decantación de los pasos de lavado puede resultar en una pobre replicación y 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, complete el pipeteo de todos los calibradores, muestras y controles de veracidad dentro de los 5 minutos. Si una pipeta automatizada está disponible utilizar una placa completa de 96 pocillos.
17. Si más de una placa es usada, se recomienda repetir la curva de calibración.
18. Cuando se almacenen los calibradores, asegúrese que cada vial esté sellado en 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 ej. 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. Asegurarse de 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 por la adición de solución de parada. Por lo tanto, el substrato y la solución de parada deben ser añadidos en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación durante la reacción.
23. Es esencial un preciso y exacto pipeteo, así como también el dar seguimiento al 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 aluminio con la tapa de la placa y regrese a los 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 período más largo, guardar los calibradores abiertos en alícuotas y congelar a -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento.
4. 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

1. Colectar muestras de suero de acuerdo con las correctas prácticas médicas.
2. No utilizar muestras inactivadas por calor. No utilizar preservativos de azida de sodio en las muestras.
3. Sedimentos y sólidos suspendidos en muestras pueden 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 hayan tomado lugar previo a la centrifugación. Algunas muestras, especialmente las de pacientes recibiendo terapia anticoagulante o trombolítica, pueden exhibir tiempo de coagulación incrementado. Si la muestra es centrifugada antes de que un completo coagulo se forme, la presencia de fibrina puede causar resultados erróneos. Asegúrese de que las muestras no hayan decaído previo a su uso.
4. Previo al envío, se recomienda que las muestras sean removidas del coágulo, separador de suero o glóbulos rojos.
5. Un procesamiento de muestra insuficiente, o la interrupción de la muestra durante la transportación puede provocar resultados deprimidos.

6. Evitar muestras extremadamente hemolíticas, lipémicas o turbias.
7. Tapar y almacenar las muestras a 18-25°C por no más de 8 horas, para un uso más largo las muestras 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 suavemente.
8. Previo a su uso, centrifugar las muestras descongeladas que contengan glóbulos rojos o partículas, o que sean difusas o nubosas en apariencia, para asegurar consistencia en los resultados.
9. Notar que niveles interferentes de fibrina podrían estar presentes en muestras que no tienen partícula obvia o visible.
10. Si no se verifica una apropiada colecta y preparación de muestra, o si las muestras han sido interrumpidas debido a la transportación o en su manejo, un paso adicional de centrifugación es recomendado. Las condiciones de centrifugación deberían ser suficientes para remover partículas.
11. No diluir muestras ya que el T3 existe de forma libre y combinada en la sangre, y en un estado de equilibrio. Unir variaciones de concentración de proteínas romperá el estado de equilibrio

Preparación de reactivo

1. Traer todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C) previo a su uso por al menos 30 minutos. Mezcle todos los reactivos invirtiendo suavemente previo a su uso. No inducir espuma.
2. Ajustar la incubadora a 37°C.
3. Tomar un paquete de concentrado de solución de lavado para 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 2 meses.

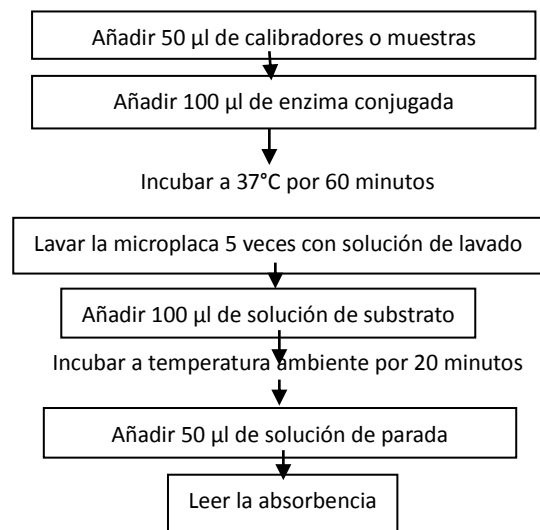
Procedimiento de medida

1. Utilizar sólo el número de pocillos requeridos y formatear los pocillos de microplacas para cada calibrador y muestra a ser probada.
2. Añadir 50 µl de calibradores o muestras a cada pocillo.
3. Añadir 100 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
4. Agitar sobre un agitador de placa por 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pocillos.
5. Cubrir la placa con una tapa e incubar a 37°C por 60 minutos
6. Descartar los contenidos de la microplaca por decantación o aspiración. Si decanta, golpea o mancha la placa, seque con papel absorbente.
7. Añadir 300 µl de solución de lavado, decantar (golpear y manchar) o aspirar. Repetir 4 veces adicionalmente para un total de 5 lavadas. Puede usarse una lavadora de bandas de microplacas automática. Al final del lavado invertir la placa y

quite cualquier residuo de solución de lavado con el papel absorbente.

8. Añadir 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo.
9. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad y permitir la reacción por 20 minutos.
10. Añadir 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
11. Agitar en el agitador de placas por 30 segundos para mezclar completamente el líquido dentro de los pocillos. Es importante asegurarse que el color azul cambie completamente a amarillo.
12. Dentro de 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



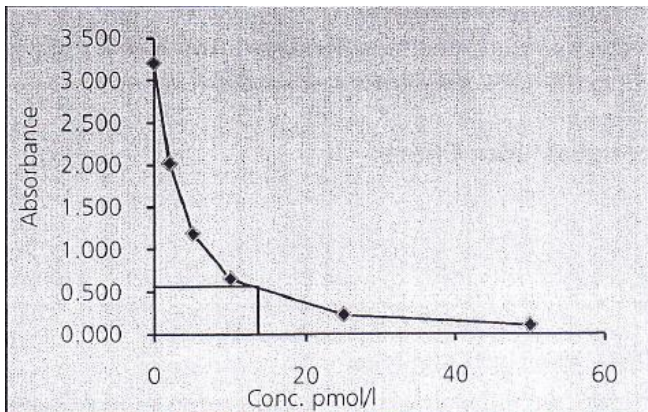
Resultados de la Medida

1. Registre la absorbencia obtenida de la impresión del lector de microplaca como se detalla en el ejemplo 1. Calcule el promedio de absorbencia de cualquier duplicado de medidas y utilice el promedio para el siguiente cálculo.
2. Trace la absorbencia contra la concentración en pmol/l para cada calibrador.
3. Dibuje la curva punto por punto a través de los puntos trazados en el papel gráfico lineal. Si una computadora es utilizada, seleccionar punto por punto la función de método de reducción de datos de ajuste de curva para generar una calibración de curva.
4. Para determinar la concentración de FT3 para un desconocido, localizar la absorbencia para cada desconocido en el axis vertical 1 (y-axis) del gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva, y lea la concentración (en pmol/l) desde el axis horizontal (x-axis) del gráfico. Si una computadora es utilizada, para determinar la concentración de FT3 para un desconocido, ingresar la absorbencia para cada desconocido y obtener la concentración (en pmol/l). En el siguiente ejemplo, la absorbencia 0.511 interseca la curva de calibración a la concentración FT3 a 15pmol/l. (Ver figura 1)

Ejemplo 1

| Muestra | Absorbancia | Valor (pmol/l) |
|---------|-------------|----------------|
| Cal A | 3.208 | 0 |
| Cal B | 2.020 | 2 |
| Cal C | 1.186 | 5 |
| Cal D | 0.653 | 10 |
| Cal E | 0.227 | 25 |
| Cal F | 0.100 | 50 |
| Ctrl 1 | 1.098 | 5.83 |
| Ctrl 2 | 0.586 | 12.36 |
| Muestra | 0.511 | 15 |

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 en forma separada.

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, una prueba adicional es sugerida 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 reactivas, interferir 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. En NTI (enfermedad no tiroidea) severo, la evaluación del estatus tiroideo se torna muy difícil. Se recomiendan medidas TSH para identificar la disfunción tiroidea.
6. Las condiciones disalbumémicas familiares pueden producir resultados erróneos en los ensayos directos del T3 libre.
7. Si un paciente, por alguna razón, tiene una lectura más alta de lo que el calibrador reporta como tal (ej: >50 pmol/l). No trate de diluir la muestra, las variaciones de TGB en diferentes

matrices no permitirá a la hormona FT3 diluirse de manera serial.

Referencia biológica de intervalo

Un rango normal de 2.8 pmol/l a 7.3 pmol (99% confianza de intervalo) 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

Esta prueba está diseñada para tener una precisión intraserial de < 10%. 2 plasmas humanos agrupados basados en miembros de panel (1 y 2) fueron probados, usando 1 lote de reactivos, en réplicas 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 | 4.95 | 0.22 | 4.53 |
| 2 | 1 | 20 | 11.43 | 0.79 | 6.88 |

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

| Miembro de panel | Lote | n | Promedio | SD entre ejecuciones | Precisión %CV |
|------------------|------|----|----------|----------------------|---------------|
| 1 | 1 | 40 | 4.15 | 0.3 | 7.22 |
| 2 | 1 | 40 | 6.77 | 0.51 | 7.53 |

2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad analítica se define como la concentración correspondiente al promedio de absorbancia de 20 réplicas del calibrador A menos 2 desviación estándar, es ≤ 0.8 pmol/l.

3. Especificidad analítica

Las sustancias mencionadas más abajo, en los niveles de concentración mencionados a su vez, fueron probadas en suero humano libre de hormonas. Los resultados fueron menos de 2 pmol/l.

| Interferente | Concentración (ng/ml) | Valor medido (pmol/l) |
|--------------|-----------------------|-----------------------|
| T4 | 100 | 1.8 |
| rT3 | 2000 | 1.71 |

4. Precisión de medida por correlación.

Se realizó un estudio de comparación donde las muestras fueron probadas utilizando este ensayo y una prueba FT3 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 | Coficiente de correlación |
|-----------------------|--------------------|--------------|-------------|---------------------------|
| e | 219 | 0.6055 | 0.984 | 0.991 |

Literatura de referencia

1. Piketty M, d' Herbomez M, Le Guillouzc D, et al. Clinical comparison of three labeled-antibody immunoassays of free triiodothyronine. Clin Chem. 1996;42(6):933-941 .
2. Wilkins T, Midgley J, Stevens R, Caughey I, Barron N. Assay performance and tracer properties for two analog-based assays of free triiodothyronine. Clin Chem. 1986;32(3) :465-469.
3. Bartalena L, Robbins J. Variations in Thyroid Hormone Transport Proteins and Their Clinical Implications. Thyroid. 1992;2(13):237-245.
4. Carrero JJ, Qureshi AR, Axelsson J, et al. Clinical and biochemical implications of low thyroid hormone levels (total and free forms) In euthyroid patients with chronic kidney disease. J. Intern. Med. 2007;262(6):690-701 .
5. Verheecke P. Free triiodothyronine concentration in serum of 1050 euthyroid children is inversely related to their age. Clin Chem. 1991 :43(6):963-967 .