

INTENCIÓN DE USO

La determinación de T3 es un factor importante en el diagnóstico de Hipotiroidismo e Hipertiroidismo. Los niveles de T3 decrecen en pacientes con Hipotiroidismo y se incrementan en pacientes con Hipertiroidismo.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El T3 ELISA es una Elisa de fase sólida competitiva. Las muestras, la solución Anti-T3/Biotina y la enzima conjugada diluida son agregadas a los pocillos recubiertos con estreptavidina. El T3 del paciente compite con el conjugado T3/enzima (HRP) por los sitios de unión con el anti-T3/Biotina. Los pozos son lavados 3 veces solución Buffer (1X) para remover el conjugado T3 no unido. Una solución de TMB es entonces agregada provocando el desarrollo del color. El desarrollo de color es frenado con la adición de la solución de Paro. La intensidad del color es inversamente proporcional a la cantidad de T3 presente.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con estreptavidina	12x8x1
2. Estándares de T3: 6 viales (listos para uso)	0.5 ml
3. Diluyente	12 ml
4. Sustrato TMB :1 frasco (listo para su uso)	12 ml
5. Solución de Paro: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Buffer de Lavado Concentrado (20X)	25 ml
7. T3 Enzima (HRP)Conjugada Concentrada :11X	1.2 ml

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector de micro ELISA con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadriculado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el equipo de 2°- 8° C. Mantenga las tiras de pocillos selladas en la bolsa de aluminio. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
2. No exponga los reactivos al calor, sol o luz intensa.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

El suero debe ser separado de la sangre entera obtenida por medio de técnicas médicas aceptables. Este equipo de prueba es para uso con muestras de suero sin aditivos solamente.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. **T-3 solución enzima conjugada:** Prepare una dilución 1:11, diluyendo la Enzima Conjugada T-3 con el Diluyente en un contenedor adecuado. Por ejemplo: diluya 80 µl del Conjugado con 0.8 ml de Buffer para 16 pozos (con un ligero exceso de solución). Este reactivo se debe utilizar dentro de las veinticuatro horas para el máximo funcionamiento de la prueba.
2. Conservar a temperatura ambiente (18°-26°C)
3. Preparar la solución de lavado (20x) 25ml. Adicionando 475ml de agua desionizada para llegar a una concentración (1X).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente.
2. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
3. Agregue 50 µl de estándares, muestras y controles en los pozos apropiados.
4. Agregue 100 µl de Enzima Conjugada de trabajo en cada micropozo.
5. Mezcle por 20- 30 segundos. Es importante que se complete perfectamente el mezclado en este paso.
6. Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos.
7. Remueva la mezcla de incubación vaciando el contenido de la placa en un recipiente para residuos.
8. Enjuague y sacuda los micropozos 3 veces con solución de lavado.(1X)
9. Golpee los micropozos sobre papel absorbente para remover todas las gotas de agua residuales.
10. Agregue 100 µl de solución sustrato TMB en cada micropozo. Mezcle suavemente por 5 segundos.
11. Cubra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
12. Detenga la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada micropozo.
13. Mezcle por 15 segundos. **ES MUY IMPORTANTE QUE SE ASEGURE QUE EL COLOR AZUL CAMBIE COMPLETAMENTE A UN TONO AMARILLO.**
14. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de microelisas en los siguientes 15 minutos.

EL PUNTO DE LAVADO DE MICROPOZOS ES CRÍTICO YA QUE UN POBRE LAVADO DARA COMO RESULTADO IMPRECISION O LECTURA ELEVADA FALSA DE LA PRUEBA.

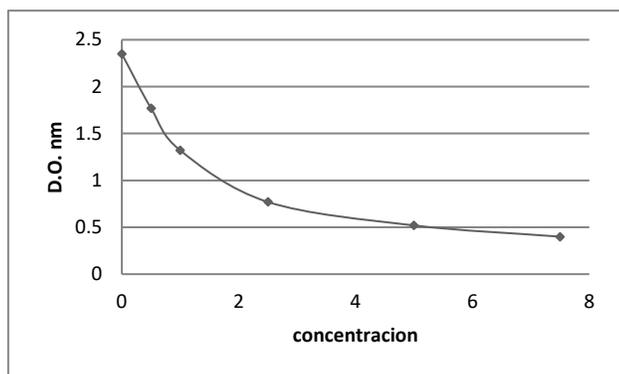
CÁLCULO DE RESULTADOS

1. Calcule los valores de absorbancia media (A450) para cada juego de estándares de referencia, control y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en IU/ml sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de T3 en mIU/ml desde la curva estándar.

Ejemplo de curva estándar

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm son mostrados en el eje Y contra las concentraciones de T3 mostradas en el eje X. Esta curva estándar tiene el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento

	OD. 450 mn	T3 (ng/ml)
Std 1	2.35	0.0
Std 2	1.77	0.75
Std 3	1.32	1.5
Std 4	0.77	3.5
Std 5	0.52	6.0
Std6	0.40	9.0



VALORES ESPERADOS

	(105 samples)
Mean	1.184
Standard deviation	0.334
Expected	0.52-1.85

SENSIBILIDAD

La mínima concentración detectable de T3 bajo este procedimiento se estima en 0.04 ng/ml.

REFERENCIAS

1. Walker W.H.C. Introduction: an approach to immunoassay. Clin. Chem. 1977; 23: 384
2. Kirkegaard C., Friis T and Siersbanck-Nielsen K. Acta Endocrinol. 1974; 77:71
3. Wisdom G.b. Enzyme- Immunoassay. Clin. Chem. 1976; 22: 1243
4. Hoffenberg R... Medicine 1978; 8: 392
5. Lieblich J., Utiger R.D. J. Clin. Invest. 1972; 51: 1939