

INTENCIÓN DE USO

Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de Triiodotironina Libre (T3) en suero o plasma humano. Agente de diagnóstico in vitro. Para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

DESCRIPCIÓN

Más del 99% de T3 circulante en sangre se encuentra unido a proteínas de transporte, principalmente la Globulina fijadora de Tiroxina (TBG). Sin embargo, solo la porción libre (no unida) de T3 es responsable de la acción biológica. Además, las concentraciones de las proteínas de transporte se ven alteradas en diversas condiciones clínicas, por ejemplo, el embarazo. En el normal funcionamiento de la tiroides, mientras las concentraciones de transportadores de proteínas se alteran y los niveles de T3 total cambian, los niveles de T3 libres se mantienen constantes. Así, las mediciones de T3 libres resultan más confiables y tienen mayor correlato con la condición clínica que los niveles de T3. El aumento en niveles de T3 total asociados al embarazo, uso de anticonceptivos orales y terapias de estrógeno, resultan en niveles elevados de T3, mientras que la concentración de T3 libre permanece básicamente sin cambios.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

FT3 ELISA Calbiotech es un método Elisa en fase sólida competitiva. Las muestras, la solución de anticuerpo T3-Biotina y el conjugado enzimático de T3 Libre, se añaden a los pocillos designados recubiertos con Streptavidina. El T3 Libre en el suero del paciente compete por los lugares de unión con un conjugado enzimático T3 (HRP). El T3 no unido, así como el exceso de conjugado enzimático de T3 Libre, son lavados por la solución de lavado. Tras la adición del sustrato, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de T3 Libre en las muestras. Una curva estándar se prepara sobre la intensidad del color a la concentración de la T3 Libre.

MATERIALES PROVISTOS	96 pruebas
1. Micropozos recubiertos con Estreptavidina	12X8X1
2. Estándares de FT3: 6 viales (listos para su	0.5ml
3. FT3 Enzima conjugada concentrada: 1 frasco	12ml
4. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12ml
5. Solución de paro: 1 frasco (listo para su uso)	12ml
6. Buffer de lavado concentrado (20X)	25ml
7. Inserto	1 pieza
8. Certificado de análisis	1 pieza

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450 nm 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 reactivo a una temperatura de entre 2°C a 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. 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.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo, no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede resultar en datos no válidos.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a una temperatura de entre 2°C a 8°C por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamientos de la muestra.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Preparar solución de lavado a 1x adicionando 475ml de agua destilada o desionizada al frasco de (25ml a 20x). Guarde a temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Previo al ensayo, permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18°-26°C). Mezcle suavemente los reactivos antes de su uso.
2. Corte el número de pozos a utilizar en cada ensayo para cada muestra. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
3. Agregue 50 µl de estándares, muestras y controles en los pozos apropiados.
4. Agregue 100 µl de la enzima conjugada en todos los pocillos.
5. Agite gentilmente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar los reactivos.

- Cubra e incube a temperatura ambiente por 60 minutos (18°C-26°C).
- Retire el líquido de los pocillos. Enjuague y lave los pocillos tres veces con 300 µl de solución de lavado de 1X. Golpee la placa de los micropocillos sobre el papel absorbente para remover las gotas de agua residuales.
- Agregue 100 µl de sustrato TMB en todos los pocillos.
- Cubra e incube a temperatura ambiente por 15 minutos.
- Frene la reacción agregando 50 µl de solución de frenado a cada pozo. Golpee gentilmente para facilitar el mezclado de la solución.
- Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa en un plazo no mayor a 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

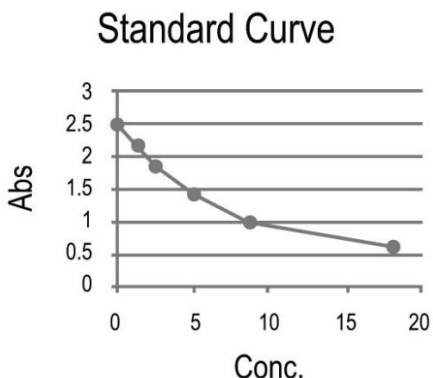
CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

- Compruebe el valor estándar de T3 Libre en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de verificar el valor de cada kit. Véase el ejemplo de la norma adjunta.
- Para construir la curva estándar, trazar la absorbancia para el estándar de T3 Libre (eje vertical) frente a las concentraciones estándar de T3 Libre (eje horizontal) en un papel gráfico lineal. Dibuje la mejor curva a través de los puntos.
- Lea la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida. Registre el valor de cada control o muestra desconocida.

Ejemplo de curva estándar

	OD 450 nm	Conc. pg/ml
Std 1	2.467	0
Std 2	2.149	2.5
Std 3	1.823	4.0
Std 4	1.383	7.0
Std 5	0.976	14.0
Std 6	0.591	22.0



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de T3 Libre fueron establecidos por la CBI y pueden ser utilizados únicamente como guía:

Clasificación	pg/ml
Adultos	1.4-4.2

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

- Los resultados obtenidos mediante la utilización de este kit sirven solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, síntomas y otros procedimientos de diagnóstico.
- No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

CARACTERISTICAS DE RENDIMIENTO

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 128 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. Fueron obtenidos los siguientes resultados:

Correlación	Pendiente	Intercepción
0.95	0.925	0.15

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	16	1.3	0.16	11.9
2	16	4.2	0.17	4.1
3	16	7.1	0.17	2.4

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estándar	Coefficiente de Variación (%)
1	10	1.4	0.15	10.7
2	10	4.4	0.13	5.2
3	10	7.0	0.30	4.2

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba fue al calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	Media + 2SD
Zero Standard	0.05 ng/ml

4. Especificidad:

La reactividad cruzada del anticuerpo Triiodotironina a 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 sustancia de interferencia y la dosis de Triiodotironina necesaria para desplazar la misma cantidad de trazador.

Esteroides	Reactividad	Concentración
I-Triiodotironina	1.0000	-
I-Tiroxina	<0.0002	10
Iodotirosina	<0.0001	10
Diiiodotirosina	<0.0001	10
Diiiodotironina	<0.0001	10
Fenilbutazona	<0.0001	10
Salicilato de Sodio	<0.0001	10

REFERENCIAS

- Pederson, K.O, Scand. J. Clin. LAB Invest 34, 247 (1974).
- Wild, D. *Immunoassay Handbook*, Stockton Press P339 (1994).
- Wenzel K.W., *Metabolism* 30, 717, (1981).
- Bhagat, C. et.al, *Clin Chem* 28, 1324. (1983).
- Lundberg, P.R., ET. Al, *Clin Chem* 28, 1241. (1982).
- Melmed, S. et. Al, *clin Endocrinol Metab* 54, 300. (1982).
- Lalloz M.R., et. al, *clin Endocrinol* 18, 11. (1983).