

Bio-T3 Captación

Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de sitios disponibles para las Hormonas Tiroideas en suero o plasma.

INTENCIÓN DE USO

El Kit de T3 captación en ELISA es utilizado para la medición de la cantidad total de sitios disponibles para las Hormonas Tiroideas en el suero o plasma humano de unión.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La glándula tiroidea bajo el control regulador de la hormona tirotrópica segrega tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3) en la circulación general. Las hormonas liberadas no circulan como moléculas libres, pero están casi en su totalidad (99,9%) ligadas a las proteínas séricas de unión hormona específica. Tres fracciones de proteínas con diferentes afinidades y capacidades para la interacción con T3 y T4 han sido identificados por electroforesis de flujo, globulina fijadora de tiroxina (TBG) lleva 65 a 75% de la concentración total en circulación, Prealbúmina fijadora de tiroxina (TBPA) tiene una avidez intermedia para la tiroxina (lleva aprox. 15-25%), pero poco o nada de avidez por Triiodotironina, la albúmina con una baja afinidad pero alta capacidad lleva 10% de la tiroxina y 30% de la Triiodotironina disponible, dado que los procesos metabólicos están regulados en su totalidad por la concentración de las hormonas tiroideas libres que están inversamente relacionados con los niveles de las proteínas de enlaces, una evaluación de la capacidad de unión de suero humano fue desarrollado en 1957 por Hamolsky en este método temprano se añadió T3 radiactivo para una muestra de sangre entera, después de un período de incubación la mezcla se centrifugó y las células rojas se lavaron. La captación de radiactividad de las células rojas estaba inversamente relacionada con la capacidad de unión del suero aunque este método tenía limitaciones severas que resultó ser una valiosa herramienta de diagnóstico además mejora la técnica en la metodología del ensayo de la prueba de captación T3 el resultado de la prueba dio diversos agentes de separación tales como carbón recubierto, resinas de intercambio iónico, albúmina desnaturada, silicatos, anticuerpos y polímeros orgánicos en lugar de las células rojas. Esta metodología de inmunoensayo enzimático de microplaca ofrece al técnico una sensibilidad óptima mientras que requiere pocas manipulaciones técnicas. En este método, suero de referencia, muestra del paciente, o el control se añade primero a una microplaca, se añaden enzimas T3 conjugada y la tiroxina (T4), y luego se mezclan. Las proteínas de unión endógenas de la muestra reaccionan con la tiroxina pero no con el conjugado de enzimas esto conduce a una mayor unión del conjugado enzima al anticuerpo sitios de combinación, reactivos para la Triiodotironina y tiroxina así como en la capacidad de unión de la muestra aumenta. Después de la finalización del período de incubación requerido, el anticuerpo unido a enzima tiroxina conjugada se separa del conjugado de enzima tiroxina no unida por aspiración o decantación, la actividad de la enzima presente en la superficie del pozo es cuantificada por la reacción con un sustrato adecuado para producir color. El empleo de varias referencias del suero de la capacidad de unión de la hormona tiroidea insaturado conocido permite la construcción de un gráfico de la absorbancia y la concentración de la comparación de la curva de respuesta a la dosis, la absorbancia un espécimen desconocido se puede correlacionar con la hormona tiroidea con la capacidad de unión.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

Los componentes necesarios para la evaluación de la capacidad de unión de suero humano son enzima conjugada T3, la tiroxina, la proteína de unión (P), y el anticuerpo inmovilizado tiroxina (Ab) Al mezclar la enzima conjugada y tiroxina con el espécimen, un enlace resultado de la reacción entre las proteínas de unión del paciente y la tiroxina (T4) no se consume en la reacción 1 a continuación, se completa con la enzima conjugada T3 para un número limitado de insolubles sitios obligatorios, después de que se alcanza el equilibrio, la fracción de anticuerpo unido se separa de la enzima-antígeno no unido por decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción de anticuerpo unido es directamente proporcional a la capacidad de unión de la muestra, Así, en el hipotiroidismo las proteínas de unión están relativamente insaturados (debido al bajo nivel de hormonas tiroideas) resultando en un mayor consumo de la hormona tiroxina que al espécimen eutiroides. Esto conduce a una mayor unión de la enzima conjugada Triiodotironina causado por la disminución de la concentración de la tiroxina disponible.

En el hipertiroidismo, lo contrario es verdadero. Las proteínas de unión son relativamente saturadas con tiroxina (debido al alto nivel de la hormona tiroidea) que resulta en un menor consumo de la tiroxina añadida, la restante Tiroxina es relativamente mucho más alta que un espécimen eutiroides resultando en menor unión de anticuerpo encima-antígeno debido al incremento de competencia de la tiroxina por los sitios limitados de anticuerpos.

MATERIALES PROPORCIONADOS	96 Pruebas
1. Micropocillos recubiertos con antígeno suero antioxidante	12x8x1
2. Calibradores (4 viales)	1 ml
3. Enzima conjugada T3U	1.5 ml
4. Buffer Conjugado T3U	13 ml
5. Solución de Lavado concentrada	20 ml
6. Substrato A	7 ml
7. Substrato B	7 ml
8. Solución de paro	8 ml

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 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrulado.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

1. Almacene el kit a 2-8 ° C.
2. Mantenga los pocillos sellados en una bolsa seca con desecantes.
3. Los reactivos son estables hasta el vencimiento del kit.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Materiales Potencialmente biopeligrosos:
1. El calibrador y los controles contienen componentes de fuente humana los cuales han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de la hepatitis B, así como de anticuerpos del HIV con reactivos con licencia FDA. Sin embargo no existe un método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus de HIV, Hepatitis B u otros agentes infecciosos. Estos reactivos deben ser manejados en el nivel de bioseguridad 2, tal como se recomienda en los Centros de Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de la Salud Manual, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
 2. Este kit está diseñado para uso exclusivo en investigación.
 3. No pipetear con la boca. No fumar, comer o beber en las áreas en las que las muestras o los reactivos del kit se manejan.
 4. Los componentes de este kit están destinados para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no deben mezclarse.
 5. Se recomienda que las muestras de suero se realicen por duplicado.
 6. Los resultados óptimos se obtienen mediante la estricta adhesión al protocolo de prueba. Pipeteado preciso así como la hora exacta y los requisitos de temperatura es esencial.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Recolecte sangre por venopunción. Separe el suero por centrifugación. EVITE AGREGAR ANTI-COAGULANTES A LA MUESTRA. En caso de no hacer el examen inmediatamente, refrigere la muestra 2°- 8° C o congele.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Reactivo de trabajo A T3U enzima solución de conjugado

Diluir el conjugado enzima-T3U 1:11 con buffer de T3 captación conjugado en un recipiente adecuado. Por ejemplo, diluir 160 µl de conjugado con 1,6 ml de buffer para 16 pozos (sobra un ligero exceso de solución).

Este reactivo debe utilizarse dentro de veinticuatro horas para el máximo rendimiento del ensayo.

Conservar a 2-8 ° C.

2. Buffer de lavado

Diluir el contenido del concentrado lavador con 1000 ml de agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Guarde a temperatura ambiente 18-26 ° C.

3. Solución de sustrato de trabajo

Vierta el contenido del vial Solución etiqueta "A" en la solución de la etiqueta "B". Mezclar y almacenar a 2-8 ° C. Utilice dentro de 60 días. Para períodos de uso más largos determinar la cantidad de reactivo necesario y preparar mezclando porciones iguales de sustrato A y B en un recipiente adecuado. Por ejemplo añadir 1 ml de A y 1 ml de B para 16 pocillos (sobrara un ligero exceso de solución, deseche la porción no utilizada).

Nota: No use el sustrato de trabajo si se ve azul.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con el análisis, lleve todos los reactivos, suero y controles a temperatura ambiente (18-26°C)

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en la charola. Devuelva los micropozos no usados a la bolsa de aluminio, sellar y almacenar a 2-8 ° C.
2. Pipetear 25 µl de los estándares de referencia, controles o especímenes en el pozo asignado.
3. Agregue 100 µl de reactivo de trabajo A, solución T3U-enzima a todos los pocillos.
4. Mezclar la microplaca suavemente por 20-30 segundos y cubrir.
5. Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Deseche el contenido de la microplaca por decantación o aspiración.
7. Enjuague y golpee la charola de los Micropozos 3 veces con 300 µl de buffer de lavado (no utilice agua de la llave). Golpee los pozos firmemente hacia el papel absorbente para quitar las gotas de agua residuales.
8. Agregue 100 µl de solución de trabajo de sustrato a todos los pocillos (ver sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.
9. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.
10. Añadir 50 µl de solución de paro a cada pocillo y mezclar suavemente durante 15 a 20 segundos.
11. Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (utilizando una longitud de onda de referencia de 620-630 nm para minimizar así las imperfecciones) en un lector de microplacas. El resultado debe ser leído dentro de los treinta minutos de la adición de la solución de parado.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe probar controles en los niveles en el rango hipotiroideo, eutiroideo e hipotiroidismo de rendimiento del ensayo de monitoreo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y valores determinados en cada procedimiento de prueba realizada. Gráficos de control de calidad se deben mantener para seguir el desempeño de los agentes suministrados. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. Desviación significativa del funcionamiento establecido puede indicar el cambio inadvertido en condiciones o la degradación de los reactivos del kit experimentales. Los reactivos frescos se deben utilizar para determinar la razón de las variaciones.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles.
2. El pipeteo de las muestras no debe extenderse más allá de los diez minutos para evitar la deriva del análisis.
3. Si se utiliza más de un plato. Se recomienda repetir la curva de dosis respuesta.
4. La adición a la solución de sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de paro. Por lo tanto, la adición del sustrato y la solución de paro deben añadirse en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
5. Si no se retira la solución adecuadamente en los pasos de lavado por aspiración o decantación puede dar lugar a resultados falsos.
6. Use componentes del mismo lote. No mezcle los reactivos de diferentes lotes.

INTERPRETACIÓN

1. El kit T3 captación depende de una multiplicidad de factores: la glándula tiroides y su regulación, la concentración de globulina de unión a T4 (TBG), y la unión de las hormonas tiroideas a TBG. Por lo tanto, la prueba de T3-captación por sí sola no es suficiente para evaluar el estado clínico.
2. El índice de tiroxina libre (FTI), que es el producto de la tasa de T3-Uptake y las concentraciones totales de tiroxina, ha ganado aceptación clínica como uno de los estudios más precisos en la evaluación del estado de la tiroides. El valor de la FTI compensa cualquier condición o drogas, tales como el embarazo o los estrógenos que alteran el TBG y los niveles de T4 pero no cambia el estatus tirometabólico.

VALORES DE REFERENCIA

0.72-1.23. este valor es adimensional.

REFERENCIAS

1. Inada M. and Sterling K.J. Clin Invest.
2. Murphy B. 1968 Radioisotopes in Medicines, US Atomic Energy Commission.
3. Hollander C.S. Shankman 1974, Methods of Hormone Radioimmunoassay.
4. Hamolsky M.W. Stein M. Freedberg. 17,33.
5. Herbert V. U.S. Patent Office (1971).
6. Mitchel M.L. Harden A.B. and O'Rourke M.E. 1474.
7. Roller E. Buzzigoli G. and Plassio 13, 892 (1972).