

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de triiodotironina total (T3) en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La glándula Tiroidea humana es el mayor componente del sistema endocrino. Las hormonas tiroideas realizan muchas funciones importantes. Ellas ejercen influencias fuertes y reguladoras esenciales en el crecimiento, diferenciación, metabolismo celular y el balance hormonal general del cuerpo, así como también en el mantenimiento de la actividad metabólica y el desarrollo de los sistemas óseos y orgánicos.

Las hormonas tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3) circulan en el torrente sanguíneo, mayormente unidas a proteínas plasmáticas, globulinas de unión a tiroxinas (TBG). La concentración de T3 es mucho menor que la de T4, pero la potencia metabólica es mucho mayor. La determinación de T3 es un factor importante en el diagnóstico de enfermedades de la Tiroidea. Su medición ha descubierto una variante de hipertiroidismo en pacientes tirotoxicos con valores elevados de T3 y con valores normales de T4. Un incremento en T3 sin un incremento en T4 es frecuentemente un precursor de tirotoxicosis recurrente en pacientes tratados previamente. La importancia clínica del T3 es también evidente en pacientes en los cuales el eutiroidismo es atribuible solo a niveles normales de T3, aunque sus niveles de T4 se encuentren por debajo de lo normal. La determinación de T3 también es útil en el monitoreo de pacientes bajo tratamiento de hipertiroidismo y para los que han discontinuado el uso de terapia anti-tiroidea. Es especialmente importante para distinguir a los pacientes que padecen de eutiroidismo de los que padecen de hipertiroidismo.

En adición al hipertiroidismo, los niveles de T3 se elevan en mujeres embarazadas y mujeres tomando anticonceptivos orales o en tratamiento de estrógeno, paralelo al incremento de TBG de manera análoga a los niveles de T4. De igual forma, una reducción en la concentración de TBG disminuye la concentración de T3, sin embargo no son un reflejo verdadero del estatus de la tiroidea.

DESCRIPCIÓN

El equipo T3 CLIA una cierta cantidad de T3 análogo es recubierta en los pocillos, una cantidad media de suero del paciente y una cantidad consistente de anticuerpo anti-T3 conjugada con peroxidasa equina son añadidas a los pocillos. El ANS es utilizado para desplazar el T3 de las proteínas para permitir la medición del total de T3 circulante. Los reactivos son incubados a 37°C durante la incubación el T3 análogo en los pocillos y el T3 presente en la muestra compiten por adherirse al anticuerpo anti-T3 monoclonal conjugado de peroxidasa equina. Después de 60 minutos a 37°C los pocillos son lavados 5 veces por el buffer limpiador para remover el anticuerpo anti-T3 conjugado. La unidad de luz relacionada (RLU) es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversa a la cantidad de T3.

CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pruebas.

1. Placa con 96 pozos.
2. Concentrado de conjugado enzimático: (1 vial, 1.6 ml).
3. Diluyente de conjugado enzimático (2 viales, 7.5 ml).
4. Calibradores: 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 ng/ml (6 viales, 1 ml).
5. PBS-T en polvo (2 sobres, 5 g).
6. Sustrato A 6.0ml.
7. Sustrato B 6.0 ml.
8. Control 1 y 2 (lío-filizado).
9. 1 bolsa zip-lock.
10. 2 piezas de papel auto-adherible.
11. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO PROVISTOS

1. Pipetas de precisión y puntas, 0.1ml, 0.05 ml, 1.0 ml.
2. Agua destilada.
3. Papel absorbente o una toalla de papel.
4. Mezclador Vórtex.
5. Papel para gráfica logarítmica.
6. Luminómetro.
7. Agitador Magnético.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Los Kits de prueba sin abrir deben conservarse a 2°C-8°C, y la microplaca se debe mantener en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo de prueba se puede utilizar hasta la fecha de vencimiento del kit.
2. Almacene los calibradores a 2-8°C, bajo estas condiciones la estabilidad será de 1 mes, para un uso por más tiempo, almacene en alícuotas y congelar a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Colecte las muestras de sangre de acuerdo a las correctas prácticas médicas.
2. No utilice muestras inactivadas por calor. No use ácido sódico como preservador.
3. Asegúrese de que el coágulo se formó completamente antes de centrifugar. Los sedimentos y sólidos suspendidos pueden interferir con el ensayo, deben ser removidos por centrifugación.
4. Evite muestras excesivamente hemolizadas, lipémicas o turbias. Antes de su utilización, las muestras pueden ser protegidas y almacenadas hasta por 48 horas a 2-8°C. Para un almacenamiento más prolongado, congelar las muestras a -20°C. Las muestras descongeladas deben mezclarse antes de la prueba.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de su uso.
2. Ajuste de la incubadora a 37°C.
3. Prepare el reactivo de enzima conjugada: añadir 0,1 ml de enzima conjugada concentrada a 1 ml de diluyente (dilución 1:10), y mezclar bien. La cantidad de enzima conjugada diluida es dependiendo del tamaño de su ensayo. El reactivo conjugado es estable durante 7 días a 4°C.
4. Prepare la solución de lavado: añadir un sobre de PBS-T en polvo a 500 ml de agua destilada y mezclar bien con agitador magnético. La solución de lavado es estable a temperatura ambiente durante 2 meses.
5. Para preparar la mezcla de sustrato: mezclar suavemente el sustrato A y B en la proporción de 1:1, 20 minutos antes de usarla. El sustrato preparado (después de la mezcla) es estable a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 12 horas. Descartar el exceso después de cada uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos a utilizar.
2. Agregar 50 µl de los calibradores, muestras y controles en los pocillos apropiados.
3. Agregar 100 µl de enzima conjugada diluida a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
4. Cubrir la placa con papel adherente e incubar a 37°C por 60 minutos.
5. Deseche la mezcla vaciando o aspirando el contenido de la placa en un contenedor de residuos. Enjuagar y vaciar la placa 5 veces con 350 µl de solución de lavado. Secar la placa golpeándola sobre un papel absorbente para eliminar todas las gotas de solución de lavado residual.
6. Agregar 100 µl de la mezcla de sustrato previamente preparado. Mezcle Suavemente durante 10 segundos.

- 7.- Incubar a temperatura ambiente en completa oscuridad durante 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU con un Luminómetro.

NOTAS IMPORTANTES

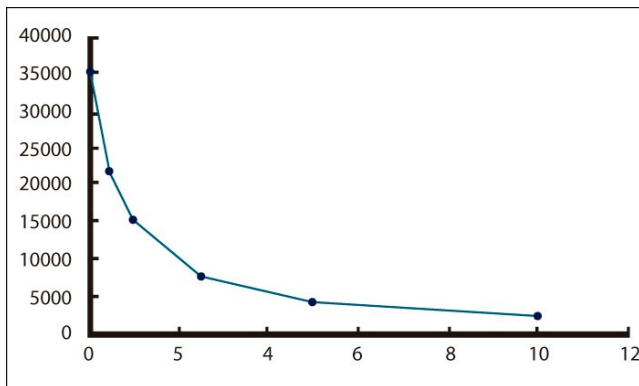
1. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
2. No mezclar o usar componentes de kits con diferentes números de lote.
3. Se recomienda que no más de 32 pozos se utilicen para cada ensayo, si la pipeta es manual, ya que el pipeteo de todos los estándares, muestras y controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa completa de 96 pozos puede ser utilizada si la pipeta es automática.
4. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión y resultados inválidos.
5. La duplicación de todos los estándares y especímenes, aunque no es obligatorio, se recomienda.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Registre los RLU's obtenidos del Luminómetro. Calcule la media en caso de realizar las mediciones por duplicado y utilice esas medias para los cálculos siguientes. Grafique los RLU's contra las concentraciones en ng/mL para cada calibrador. Dibuje la curva de punto a punto a través de los puntos graficados en papel milimétrico. Si es usada una computadora, seleccione el método de reducción de datos ingresados con función de curva punto a punto para generar la curva de calibración. Para determinar la concentración de T3 de una muestra desconocida, localice los RLU's para cada muestra en el eje vertical (Y) de la gráfica, encuentre el punto de intersección en la curva, y lea la concentración del eje horizontal (X) de la gráfica. Si es usada una computadora, para determinar la concentración de T3 de una muestra, ingrese los RLU's de cada muestra y obtenga la concentración.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

T3 (ng/ml)	RLU
0	145410
0.5	78580
1.0	49487
2.5	25476
5.0	12334
10.0	5914



Nota: los valores aquí mostrados son solamente para ilustración y no deben usarse como curva de calibración.

VALORES DE REFERENCIA

El rango normal de 0.8 a 1.9 ng/ml (95% de intervalo de confianza) fue obtenido probando muestras séricas de 147 individuos definidos como normales por un clínico. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios rangos de referencia basándose en la población a evaluar. La concentración mínima detectable por este ensayo está estimada en **0.2 ng/ml**.

PERFORMANCE

1. Precisión:

Este ensayo fue diseñado con una precisión Intra-ensayo de <10%. 2 sueros humanos (bajo y alto) fueron probados, usando un lote de reactivo con 20 repeticiones. Los datos se muestran en la tabla siguiente.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
1	1	20	1.02	5.78
2	1	20	7.13	0.227

Este ensayo está diseñado para tener una precisión Inter-ensayo de <15%. 2 sueros humanos (bajo y alto) fueron probados usando un lote de reactivo con dos repeticiones, una vez por día por 20 días de prueba. Los datos se muestran a continuación.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
1	1	40	1.11	4.89
2	1	40	6.96	0.392

2. Sensibilidad:

Se define como la concentración correspondiente a la media de RLU's de 20 repeticiones del calibrador A menos 2 SD, es de ≤ 0.15 ng/ml.

3. Especificidad:

Este ensayo está diseñado para tener una especificidad de menos que 0.5% de reacción cruzada con las sustancias debajo enlistadas a las concentraciones ahí indicadas.

Substancia	Concentración	Valor medido	Reactividad cruzada
T4	500	0.44	0.088
rT3	500	0.26	0.052

4. Medición de precisión por correlación:

Un estudio fue realizado, en el que las muestras fueron probadas usando este ensayo y un ensayo de T3 por ELISA, el cual está actualmente disponible en el mercado. Los datos analizados se muestran a continuación.

Método de correlación	Nº de muestras	Intercepto	Pendiente	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	112	0.3762	0.9479	0.954

REFERENCIAS

1. Chopra IJ, Ho RS, Lam R. An improved radioimmunoassay of triiodothyronine in serum: its application to clinical and physiological studies. J. Lab. Med. 1972; 80(5): 729-739.
2. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test. Ann. Clin. Biochem. 1997; 34(Pt 6): 579-581.
3. Santini F, Pinchera A, Ceccarini G, et al. Evidence for a role of the type III-iodothyronine deiodinase in the regulation of 3,5,3'-triiodothyronine content in the human central nervous system. Eur. J. Endocrinol. 2001; 144(6): 577-583.
4. Nikkilä EA, Kekki M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. J. Clin. Invest. 1972; 51(8): 2103-2114.