

INTENCIÓN DE USO

El ensayo fT3 está destinado para la cuantificación de la concentración de fT3 en el suero humano.

RESUMEN Y APLICACIÓN

Las mediciones de fT3 (Triiodotironina libre) así como de fT4 (tiroxina libre), miden la hormona que no está unida a las proteínas de unión como la TBG. Las mediciones de las hormonas libres son muy difíciles debido a que las concentraciones son muy bajas. Comparada con la fT4 y la TSH (tirotropina), la concentración de la fT3 no es frecuentemente determinada. En primer lugar porque su concentración permanece normal aunque el hipertiroidismo es severo y la fT3 está restringida a un diagnóstico particular donde el hipertiroidismo necesita ser confirmado, y finalmente, las determinaciones de fT3 están restringidas a departamentos especializados. La T3 total circula en la sangre casi completamente unida a proteínas transportadoras (>99.5%). Además, las concentraciones de las proteínas transportadoras están alteradas en varias condiciones clínicas, como en el embarazo. En los estudios clínicos de los efectos de las proteínas, la fT3 es independiente de la concentración de proteínas séricas tales como la TBG y la TBPA. Con la función normal de la tiroides, como las concentraciones de las proteínas se alteran, el nivel de T3 total cambia de modo que la concentración de fT3 permanece constante. Entonces, las mediciones de las concentraciones de fT3 se correlacionan más realmente con el estatus clínico que el nivel de T3 total. Por ejemplo, el incremento de los niveles de T3 asociados con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos resulta en niveles más altos de T3 total mientras que la concentración de fT3 permanece básicamente sin cambios. Además, se ha encontrado que la media del valor de fT3 tiene un gradiente con tendencia decreciente de jóvenes a ancianos.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este ensayo está basado en un método competitivo de un solo paso. La muestra, los micropozos recubiertos con T3 análoga y la enzima conjugada con anticuerpo anti-T3 son combinados. Durante la incubación, el T3 análogo impregnado en el micropozo y la fT3 presente en la muestra compiten por unirse a la enzima conjugada con anticuerpos. Después del lavado, un complejo es generado entre la fase sólida y la enzima conjugada por reacciones inmunológicas. El sustrato A y B son entonces agregados y catalizados por este complejo, dando como resultado una reacción quimioluminiscente. La reacción quimioluminiscente resultante es medida como RLU's. Los RLU's son inversamente proporcionales a la cantidad de fT3 presente en la muestra.

MATERIALES SUMINISTRADOS

1. 96 Micropozos.
2. Enzima Conjugada: 2 frascos con 6 ml (peroxidasa HRP).
3. Calibradores: 0, 2, 5, 10, 25 y 50 pmol/l fT3 (6 viales de 1 ml).
4. Sustrato A: 6.0 ml (peróxido de hidrogeno en solución buffer).
5. Sustrato B: 6.0 ml (luminol en solución buffer con potenciadores).
6. PBS-Tween en Polvo (buffer de lavado, 2 bolsas de 5 g).
7. Control 1: Liofilizado
8. Control 2: Liofilizado
9. Instructivo.
10. 2 piezas de papel adherente.
11. 1 bolsa zip-lock.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión 50 µl, 100-1000 µl y puntas desechables
2. Agua destilada.
3. Agitador magnético.
4. Lavador de micropozos.
5. Mezclador Vórtex.
6. Agitadora orbital.
7. Luminómetro.
8. Incubadora.
9. Papel absorbente.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. El equipo sin abrir debe guardarse entre 2-8°C a partir de la recepción y la placa debe guardarse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo se puede utilizar hasta la fecha de caducidad del mismo. Consulte la etiqueta para ver la fecha de caducidad.
2. El equipo abierto se mantendrá estable hasta la fecha de expiración indicada, siempre y cuando se almacene según lo estipulado anteriormente.
3. Almacene los calibradores entre 2-8°C, condiciones bajo las cuales la estabilidad será de 1 mes, para almacenar por más tiempo almacene en alícuotas y congele a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelación-descongelación.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para uso profesional de diagnóstico *in vitro*.
2. El manejo de reactivos y las muestras deben ser de acuerdo con los procedimientos de seguridad local.
3. Los calibradores contienen componentes de origen humano, se han probado y no reaccionaron para el antígeno de superficie de hepatitis B, así como tampoco para anticuerpos contra el VIH. Todos los productos de origen animal y derivados han sido recogidos de animales sanos. Los componentes de origen bovino proceden de países en los que la EEB no ha sido reportada. Sin embargo, los calibradores y los componentes que contienen sustancias animales deben ser tratados como potencialmente infecciosos.
4. Evitar cualquier contacto con la piel.
5. No fumar, comer, beber o usar cosméticos en la zona de trabajo.
6. No pipetear con la boca. Usar ropa protectora y guantes desechables.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse usando técnicas estándar de venopunción y el suero debe ser separado tan pronto como sea posible. Evite la hemólisis, lipemia o turbidez excesiva.
2. Muestras de plasma recogidas en tubos que contengan EDTA, heparina u oxalato pueden interferir con los procedimientos del ensayo y deben evitarse.
3. Las muestras deberán ser niveladas y se pueden almacenar hasta por 48 horas entre 2-8°C, antes del ensayo. Los especímenes guardados por un tiempo más largo pueden ser congelados a -20°C. Los especímenes descongelados deben ser mezclados antes de la prueba.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso.
2. Ajustar la incubadora a 37°C.
3. Reconstituir cada control con 1 ml de agua destilada y mezclar bien por inversión durante 1 minuto. Permita que el material reconstituido repose durante al menos 10 minutos.
4. Preparación del buffer de lavado: agregue 1 sobre de PBS-T en 500 ml de agua destilada. Agite la mezcla con un agitador magnético. El buffer de lavado se mantendrá estable a temperatura ambiente por lo menos durante 2 meses.
5. Determine la cantidad de solución de sustrato necesaria y prepárela mezclando partes iguales de sustrato A y B en un contenedor limpio. Desechar esta solución si no es empleada 20 minutos después de ser mezclada.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de micropozos en la placa.
2. Dispensar 50 µl de estándares, muestras y controles.
3. Agregar 100 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
4. Mezclar suavemente durante 30 segundos. Este paso es importante.
5. Cubra la placa con el papel adherente e incuba a 37°C por 60 minutos.
6. Retire la mezcla de incubación y deseche el contenido de la placa, por decantación o aspiración, en un contenedor de residuos.
7. Enjuagar y vaciar la placa 5 veces con buffer de lavado. Golpear la placa sobre un papel absorbente o toallas de papel para eliminar todas las gotas de agua residual, el volumen del pozo es de 350 µl.
8. Dispensar 100 µl de la mezcla de solución de sustrato preparada. Mezcle Suavemente durante 10 segundos.
9. Incubar dentro del Luminómetro durante 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU para cada micropozo.

NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. La insuficiencia de lavado se traducirá en mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
2. Se recomienda que no más de 32 pozos sean utilizados para cada ensayo si el pipeteado es manual, ya que las muestras y los controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pocillos puede utilizarse si el pipeteado es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y especímenes, aunque no es obligatorio, se recomienda.

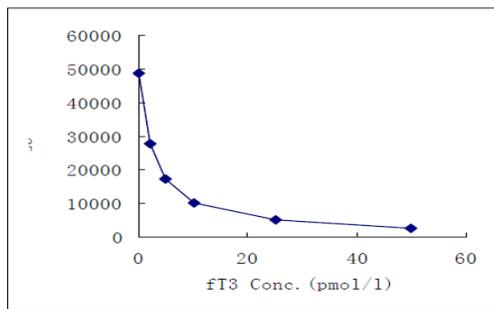
CÁLCULO DE RESULTADOS

Le recomendamos utilizar el software adecuado para el cálculo de los resultados, en caso de que esto no sea posible, construya una curva estándar trazando los RLU obtenidos a partir de cada calibrador contra su concentración en pmol/l en papel milimétrico, con los valores RLU en la vertical o eje Y, y las concentraciones en la horizontal o eje X. Utilice los RLU de cada muestra para determinar la concentración correspondiente de la fT3 en pmol/l por interpolación con la curva estándar.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Una curva típica estándar se muestra a continuación, es para fines de ilustración solamente, y nunca se debe utilizar en lugar de la curva de calibración real.

fT3 (pmol/l)	RLU
0	48,728
2	27,694
5	17,117
10	10,272
25	4,936
50	2,487



VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe de establecer sus propios rangos normales basándose en la población de pacientes. Este rango fue obtenido probando el suero de 131 pacientes definidos como normales clínicamente. Rango normal 3.5 pmol/l a 7 pmol/l.

PERFORMANCE

1. Precisión

La precisión Intra-ensayo fue diseñada para ser <10% y se determinó analizando dos sueros (bajo y alto) con 20 repeticiones.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Baja	20	4.68	0.30	6.34
Alta	20	13.87	0.84	6.06

La precisión inter-ensayo está diseñada para ser <15% y se determinó analizando duplicados de cada uno de los sueros de control en 20 corridas por separado.

Suero	Número	Media	SD	CV (%)
Baja	40	4.65	0.33	7.17
Alta	40	13.85	0.96	6.96

2. Sensibilidad

Se define como la concentración correspondiente a la media de RLU de 20 repeticiones del calibrador A menos dos desviaciones estándar. Es de ≤ 0.8 pmol/l.

3. Especificidad

Esta prueba está diseñada para tener una especificidad de menos de 2 pmol/l, con las sustancias enlistadas en seguida en suero humano libre de hormonas.

Substancia	Concentración	Valor de medición (pmol/l)	Reactividad cruzada
T4	500 µg/dL	1.09	<0.001
rT3	500 ng/mL	1.56	<0.001

CONTROL DE CALIDAD

Las buenas prácticas de laboratorio requieren que las muestras de control de calidad se procesen con cada curva de calibración para verificar el rendimiento del ensayo y la validez de los resultados. Controles con acida sódica no se deben emplear.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Este ensayo no ha sido validado para las pruebas del recién nacido. Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una completa comprensión de las instrucciones del paquete y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio.
2. Anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con el reactivo de inmunoglobulinas, interfiriendo con los Inmunoensayos *in vitro*. Los pacientes expuestos rutinariamente a los animales o productos de origen animal o suero pueden ser propensos a estos valores de interferencia y se pueden observar resultados anómalos.
3. Información adicional puede ser necesaria para el diagnóstico.
4. Los resultados obtenidos con esta prueba se deben utilizar siempre en combinación con el examen clínico, la historia médica del paciente, y otros hallazgos.

REFERENCIAS

1. Piketty M, d' Herbomez M, Le Guillouzic D, et al. Clinical comparison of three labelled-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(3):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.