



Triyodotironina (T3)

Código de producto: 175-300

Uso previsto: Determinación cuantitativa de la concentración de Triyodotironina (T3) en suero o plasma humano por prueba inmunológica de quimioluminiscencia en microplaca (CLIA)

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA:

La medición de las concentraciones de T3 está generalmente relacionada como una herramienta útil en el diagnóstico de la disfunción tiroidea. Esta importancia ha sido el motor para el desarrollo de técnicas inmunológicas en las últimas dos décadas. El advenimiento del anti suero monoespecífico y el descubrimiento de agentes bloqueadores de la T3 que se enlazan a proteínas del suero han permitido el desarrollo de procedimientos de radioinmunoensayos simple.

El presente método inmunológico provee una técnica con una sensibilidad óptima que requiere poca manipulación técnica. En este método, el suero de referencia, muestra del paciente o control se agrega primero a una microplaca de pocillos, luego se agrega conjugado enzima-T3 y luego se mezclan. La resultante es una reacción de competición entre el conjugado enzimático y la T3 nativa por un número limitado de anticuerpos inmovilizados en los pocillos.

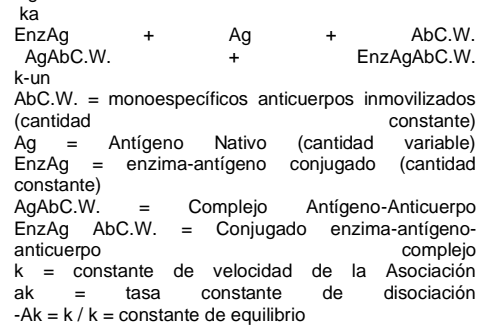
Después de completarse el período de incubación necesaria, los anticuerpos enlazados al conjugado enzima-T3 son separados de los conjugados enzima-T3 no enlazados por aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente en la superficie de los pocillos es cuantificada por reacción con un sustrato adecuado para producir luz.

El empleo de varios sueros de referencia con concentración de T3 conocida permiten construir un gráfico de actividad y concentración. De la comparación con la curva respectiva, la actividad de un suero desconocido puede ser correlacionada con la concentración de T3.

PRINCIPIO

Inmunoensayo de quimioluminiscencia (tipo 5)

Los reactivos esenciales requeridos para un inmunoensayo de fase sólida incluyen anticuerpos inmovilizados, conjugado antígeno-enzima y antígeno nativo. Luego de mezclar estos reactivos resulta una reacción de competencia entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno por un número limitado de sitios insolubles. La interacción se ilustra con la siguiente ecuación:



Después que se consigue el equilibrio la fracción de anticuerpo enlazado es separada del antígeno no enlazado por decantación o aspiración. La actividad enzimática determinada por la reacción con un sustrato que genera luz en la fracción de anticuerpo enlazado es inversamente proporcional a la concentración de antígeno nativo. Utilizando diferentes sueros de referencia de concentración de antígeno conocido se puede generar una curva en la cual se puede determinar la concentración del antígeno.

REACTIVOS

Materiales Provistos:

- Suero de referencia humano – 1 ml/vial – Icon A-F** Seis (6) viales de sueros de referencia para triyodo tironina en niveles de 0(A), 0.5(B), 1.0(C), 2.5(D), 5.0(E) y 7.5(F) ng/ml. Almacenar de 2 – 8° C Se agregó preservativo.
- Trazador T3 Total - 1.5 ml/vial** Un (1) vial de peroxidasa de rábano picante conjugado en albúmina estabilizada Almacenar de 2 – 8° C Se agregó preservativo.
- Bufer Trazador T3/T4 Total - 13 ml/vial** Un (1) botella conteniendo bufer, colorante rojo, preservante e inhibidores de proteínas. Almacenar de 2 – 8° C
- Placa de 96 pocillos de reacción con T3** Microplaca de 96 pocillos cubiertos con anticuerpos anti T3 de oveja y empacada

en bolsa de aluminio con un agente desecante. Almacenar de 2 – 8° C

- Solución de lavado concentrado – 20 ml** Un (1) vial conteniendo surfactante en buffer salino. Se agregó preservativo. Almacenar de 2 – 8° C (ver sección Preparación de Reactivos)
- Reactivo A – 7 ml/vial** Una (1) botella conteniendo luminol en buffer. Almacenar de 2 – 8° C
- Reactivo B – 7 ml/vial** Una (1) botella conteniendo Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) en buffer. Almacenar de 2 – 8° C
- Inserto de instrucciones.**

Nota 1: No usar los reactivos después de su fecha de expiración.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando se almacenan de 2 a 8° C

Nota 3: Los reactivos anteriores son para microplaca de 96 pocillos.

PRECAUCIONES:

Para uso de diagnóstico in Vitro.

No es para usar externa o internamente en humanos o animales.

Todos los productos que contienen suero humano han sido probados no-reactivos a Hepatitis B antígeno de superficie, HIV 1 y 2 y HCV por los exámenes de la FDA. Puesto que ninguna prueba conocida puede asegurar completamente la ausencia de agentes infecciosos, todos los productos que contienen suero humano deben ser manejados como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedades infecciosas.

Los procedimientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio para el manejo de productos sanguíneos se pueden encontrar en el Centro de Control de Enfermedades del Instituto Nacional de Salud, "Bioseguridad en Microbiología y Laboratorio Biomédicos" 2° Ed. 1988 HHS. Publicación N° (CDC) 88-8395

RECOLECCION Y PREPARACION DE LAS MUESTRAS:

Las muestras deben ser suero humano y se deben tener las debidas precauciones en el momento de su recolección y manejo. Las muestras de sangre deben tomarse en tubos al vacío tapa roja sin aditivos. Dejar que la sangre coagule. Centrifugar las muestras para separar el suero de las células. Las muestras deben refrigerarse de +2° a + 8° C por un máximo período de 5 días. Si la muestra no puede ser Examinada en este tiempo debe almacenarse a – 20° C hasta por 30 días. Evitar descongelar repetidas veces. Cuando se va a trabajar por duplicado, se necesita 0.100 ml de muestra.

Materiales requeridos pero no Provistos:

- Pipeta capaz de dispensar 50 ul con precisión de 1.5 %.
- Dispensador de capacidad: 0.100 ml y a.350 ml con precisión de 1.5 %
- Dispensador ajustable de capacidad: de 20 a 200 ul y 200 a 2000 ul para las diluciones del sustrato y del conjugado.
- Lavador de microplacas o una pizeta (opcional).
- Luminómetro de microplacas.
- Tubos de ensayo para diluir el conjugado enzimático y reactivos A y B
- Papel absorbente para secar los pocillos de la microplacas.
- Cubierta plástica para tapar las microplacas durante las incubaciones.
- Aspirador al vacío (opcional) para los procesos de lavado.
- Reloj cronómetro.
- Materiales de control de calidad..

PREPARACION DE LOS REACTIVOS:

- Solución conjugado T3-enzima** - Trazador de trabajo: Diluir el trazador T3 total i:11 con buffer trazador T3/T4 en un depósito limpio. Por ejemplo diluir 160 ul de conjugado en 1.6 ml de buffer para 16 pocillos; usar dentro de las 24 horas, Almacenar de + 2° a + 8° C.
Fórmula general:
Cantidad de bufer requerido= numero de pocillos * 0.1
Cantidad de enzima T3 necesaria= # de pocillo * 0.01
- Buffer de lavado:**
Diluir el contenido de la solución de lavado concentrada en 1,000 ml de agua destilada o desionizada en un depósito adecuado. Almacenar a temperatura ambiente de + 20° a + 27° C
- Solución de reactivo de trabajo:**
Almacenar de + 2° a + 8° C. Determinar la cantidad de reactivo necesario y preparar mezclando en proporciones iguales el reactivo A y reactivo B en un depósito limpio.
Por ejemplo agregar 1 ml de A y 1 ml de B para 2 tiras de 8 pocillos.

PROCEDIMIENTO DE ENSAYO:

Antes de proceder con el ensayo llevar todos los reactivos, sueros de referencia y controles a temperatura ambiente (20 a + 27°C)

- Marcar los micropocillos para cada suero de referencia, control y muestra de paciente a ser ensayada en duplicado.
NOTA: Cubrir los pocillos sin usar con el sellador de placas, sellar en la bolsa de plástico con desecante, y almacenar a 2-8 °C

- Pipetear 0.050 ml (50 ul) del apropiado suero de referencia, control o muestra en los pocillos asignados.
- Agregar 0.100 ml (100 ul) del conjugado Trazador de trabajo, enzima T3 a todos los pocillos. (ver sección Preparación de reactivos)
- Mover suavemente la placa por 20 a 30 segundos para mezclar y cubrir.
- Incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el contenido de las microplacas por decantación o aspiración. Si se decanta dar un golpecito y secar con papel absorbente.
- Agregar 350 ul de bufer de lavado (ver preparación de reactivos) decantar (golpear y secar) o aspirar. Repetir 4 veces adicionales para un total de 5 lavados. Se puede usar un lavador manual o automático. Seguir las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una pizeta, llenar cada pocillo por inclinación del depósito (evitando formar burbujas) para dispensar la solución de lavado. Decantar la sol. De lavado y repetir el procedimiento 4 veces adicionales.
- Agregar 0.100 ml (100 ul) de reactivo de trabajo a todos los pocillos (ver Preparación de reactivos). Siempre agregar los reactivos en el mismo orden para minimizar las diferencias en el tiempo de reacción de cada pocillo.
- Incubar a temperatura ambiente por 5 minutos en oscuridad.
- Leer las unidades relativas de luz en cada pocillo, por 0.5 – 1.0 segundos / pocillo, usando un luminómetro de microplacas. Los resultados deberán ser leídos entre los 30 minutos después e agregar la solución de sustrato.

NOTA: Para repetir el análisis de las muestras con concentraciones mayores a 7.5 ng/ml pipetear 25 ul de la muestra y 25 ul del suero de referencia en el pocillo de muestra (esto mantiene una concentración de proteína uniforme) Multiplicar el valor obtenido por 2 para obtener la concentración de T3

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe correr controles en niveles bajo, medio y alto para poder monitorear el performance de la prueba. Estos controles deben ser trabajados como desconocidos y los valores determinados en cada prueba. Se debe llevar un registro del control de calidad para monitorear el performance de los reactivos. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes. Cada laboratorio individualmente debe establecer sus propios límites de aceptación. Una desviación significativa de los resultados puede indicarnos un cambio no percibido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar las razones de las variaciones.

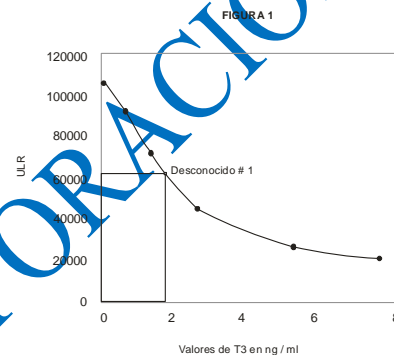
RESULTADOS:

Se usa una curva de respuesta de dosis para determinar la concentración de T3 en la muestra del paciente.

- Registrar el URL (Unidad de Luz Relativa) obtenido en el impreso del lector de microplaca como se indica en el ejemplo 1.
- Plotear las URL para cada suero de referencia versus la concentración de T3 correspondiente en ng/ml en un papel lineal gráfico.
- Dibujar la curva que mejor se ajusta a través de los puntos ploteados.
- Para determinar la concentración de T3 en una muestra desconocida localizar el promedio del URL de cada desconocido en el eje vertical del gráfico, encontrar el punto de intersección en la curva y leer la concentración (en ng/ml) en el eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido deben ser promediados según se indica) En el siguiente ejemplo el promedio del URL (63817) del desconocido intersecta la curva de calibración en la concentración de T3 de (1.4 ng/ml) (ver la figura 1)

NOTA 1 El software de reducción de datos de computadora designado para las pruebas de quimioluminiscencia también se puede usar para la reducción de datos. Los duplicados del desconocido deben ser promediados como se indica (ver figura 1)

NOTA 2 Monobind puede asistir al laboratorio en la compra e implementación de equipo / software para medir e interpretar datos de quimioluminiscencia.



* Los datos presentados en el Ejemplo 1 y Figura 1 es sólo para ilustración y no debe ser utilizado en lugar de una curva dosis-respuesta preparada

con cada ensayo. Además, los RLU de los calibradores han sido normalizados a 100,000 RLU / s para el calibrador A (mayor salida de luz). Esta conversión minimiza las diferencias causadas por la eficiencia de los distintos instrumentos que se pueden utilizar para medir la producción de luz.

EJEMPLO 1

Muestra	Pozo #	ULR / s (A)	Media URL (B)	Valor (ng/ml)
Cal A	A1	100468	100000	0
	B1	99532		
Cal B	C1	88644	86989	0.5
	D1	85333		
Cal C	E1	71996	72275	1.0
	F1	72553		
Cal D	G1	46658	45952	2.5
	H1	45247		
Cal E	A2	26556	26887	5.0
	B2	27219		
Cal F	C2	19549	18710	7.5
	D2	17871		
Cntrl. 1	E2	71096	71745	1.0
	F2	72393		
Cntrl. 2	G2	49482	49732	2.2
	H2	49981		
Paciente	A3	64506	63817	1.4
	B3	63127		

PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

Para considerar válidos los resultados de los ensayos se deben considerar los siguientes criterios:

- La curva de respuesta debe estar entre los parámetros establecidos.
- Cuatro de seis controles de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos

ANÁLISIS DE RIESGO

A. Performance de la prueba

- Es importante que el tiempo de reacción de cada pocillo se mantenga constante para asegurarnos resultados reproducibles.
- El pipeteo de la muestra no se debe extender más allá de 10 minutos para evitar que el ensayo se amontone.
- Muestras altamente lipémicas, hemolizadas o contaminadas no deben ser usadas.
- Si se va a usar más de una placa se recomienda repetir la curva de respuesta de dosis.

- La adición de reactivo inicia la reacción cinética, por lo tanto los reactivos deben ser agregados en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Faljas al remover la solución adherida en los pocillos, durante la aspiración o decantación del lavado puede resultar en una pobre replicación y resultados falsos.
- Usar componentes del mismo lote. No mezclar los reactivos de diferentes lotes.
- Un pipeteado preciso, así como seguir los tiempo exactos y temperaturas requeridas son esenciales. Cualquier alteración de las instrucciones de uso de Monobind pueden concluir en resultados imprecisos.
- Se deben aplicar todos los estándares nacionales, regulaciones y leyes así como los procedimientos de las buenas prácticas de laboratorio para asegurarnos un correcto uso de los instrumentos.
- Es importante calibrar todos los equipos Ej. Pipetas, lectores, lavadores y/o los equipos automatizados usados con este kit. Así como también seguir los programas de mantenimiento preventivo.
- Análisis de riesgo – como los requeridos por la directiva CE 98/79/EC; para este u otros kits hechos por Monobind pueden ser solicitados por email a: monobind@monobind.com

B. Interpretación

- Los resultados de laboratorio son solamente un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben ser la única base para determinar la terapia, particularmente si los resultados entran en conflicto con otros determinantes.
- Para validar los resultados, los controles adecuados y otros parámetros deben estar entre los rangos listados y pruebas requeridas.
- Si los kits son alterados, ya sea por mezclar partes e diferentes kits, se pueden producir falsos resultados o si los resultados son incorrectamente interpretados, **Monobind no tiene responsabilidad.**
- Si se usa una reducción de datos de computadora para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores esperados para los calibradores estén en el 10 % de las concentraciones esperadas.
- La concentración total de triyodotironina depende de una multiplicidad de factores, la función de la glándula tiroidea y su regulación, la concentración de la tiroxina enlazada con a globulina (TBG) y la triyodotironina enlazada a la TBG (3,4) así pues la concentración de T3 de manera aislada no tiene un valor diagnóstico determinante de la situación clínica.
- Una disminución de T3 se encuentra cuando hay enfermedades que eliminan proteínas, ciertas enfermedades del hígado, la administración de testosterona, difenilhidantoina salicilatos. Una tabla de drogas interferentes y de condiciones que afectan los valores e T3 totalhan sido compilados por la Revista de la Sociedad Americana de Química Clínica (AACC).

RANGO DE VALORES ESPERADO

Un estudio en población adulta determinó que los valores de T3 total por el método de AccuLite CLIA fueron:

TABLE I

Valores esperados para T3 Acculite CLIA (en ng/ml)

Media (X):	1.22
Desviación Estandar:	0.35
Rangos esperados:	0.52 – 1.98

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de rangos de valores los cuales pueden ser esperados por un método determinado para una población de "personas normales" depende de una multiplicidad de factores: la especificidad del método, la población examinada y la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de valores esperados.

CARACTERISTICAS DE PERFORMANCE

A. Precisión:

La precisión de las pruebas de T3 Monobind Acculite CLIA fueron determinados por análisis en tres diferentes niveles de control de suero. El número, valor medio, desviación estandar y coeficiente de variación de cada uno de estos controles de suero se presentan en las tabla 2 y tabla 3.

TABLE 2

Prueba de precisión interno (ng/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	16	0.85	0.058	6.8%
Normal	16	2.25	0.123	5.5%
Alto	16	3.20	0.134	4.2%

TABLE 3

Prueba de precisión externo (ng/ml)

Muestra	N	X	S.D.	C.V.
Bajo	10	0.81	0.068	8.4%
Normal	10	2.19	0.145	6.6%
Alto	10	3.32	0.176	5.3%

* Medido en 10 experimentos por duplicado.

B. Exactitud

El procedimiento de T3 Monobind Acculite fue comparado con una prueba de ELISA. Se examinaron muestras biológicas de concentraciones bajas, normal y elevadas. El número total de las muestras fue 110. La

menor ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación fueron computados para el T3 CIA en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos están desarrollados en la Tabla 4

TABLE 4

Análisis de regresión cuadrada

Método	Media	Coef Co.
Este método	1.43	0.976
Referencia (Y)	1.48	

$$Y = -0.062 + 0.957 (X)$$

Sólo cantidades pequeñas de bias entre este método y el método de referencia se indican por la cercanía de los valores medios. La ecuación de regresión cuadrada y el coeficiente de correlación indica concordancia excelente entre los métodos.

C. Especificidad

La reactividad cruzada de los anticuerpos de T3 a sustancias seleccionadas fue determinada agragando las sustancias de interferencia a una matriz de suero de varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada por derivación del radio entre la dosis de sustancia interferentes y la dosis de T3 necesitada para desplazar la misma cantidad de trazador.

Sustancia	Reactividad cruzada	Conc.
I T3	1.0000	-
I- tiroxina	<0.0002	10ug/ml
Iodotirosina	<0.0001	10ug/ml
Diiodotirosina	<0.0001	10ug/ml
Diiodotironina	<0.0001	10ug/ml
Fenilbutazona	<0.0001	10ug/ml
Salicilato Sodio	<0.0001	10ug/ml

D. Sensibilidad

El procedimiento de la prueba de T3 tiene una sensibilidad de 0.04 ng/ml. La sensibilidad fue establecida por determinación de la variabilidad del suero calibrador 0 ng/ml y usando 2DV (95%) en la estadística para calcular la dosis mínima.

REFERENCIAS:

- 1 H Ghand, RJ Ryan, NOSOTROS Mayberry, & T Hockett, "Radioinmunoanálisis para la triyodotironina (T3): afinidad y especificidad de anticuerpos para el T3", J Endocrinol Clínica, 33, 509 (1971).
- 2 Chopra IJ, Ho RS & R Lam, "Un inmunoensayo mejor - radio de triyodotironina en el suero humano", Laboratorio Clínico J Med, 80, 729 (1971).
- 3 DS jóvenes, LC Pestaner, y U Gilberman, "Efectos de las drogas en pruebas de laboratorio clínico", Química

Clínica, 21, 3660 (1975).

4 L de ley, Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad de la tiroides, de Cleveland, CRC Press, 9, 51 (1975).

5 N Tietz, de libros de texto de Química Clínica, 3ª Ed Saunders, el Banco Mundial, Filadelfia (1999).

6 Harrison, Principios de Medicina Interna, 12 Ed Hill, McGraw, Nueva York (1998).

7 Surks MI, IJ Chopra, NC Mariash, "Asociación Americana de la Tiroides Directrices para el uso de pruebas de laboratorio en los trastornos de la tiroides, JAMA, 263, 1529 a 1532 (1990).

8 Gruhn JG, Barsano CP, Kumar S, "El desarrollo de las pruebas de función tiroidea", Arch Pathol Lab Med, 111, 84-100 (1987).

9 Bartalena L, "los logros recientes en los estudios sobre la tiroides proteínas de unión a las hormonas", endocrinos Ap 11, 47-64 (1990).

10. Engler D, Burger AG, "La desyodación del yodotironinas y de sus derivados en el hombre", endocrinos Rev, 5, 151 (1984).

Versión: 3 Fecha: 11/2/2010 ACA: 0383 Gato #: 175-300

INSTRUMENTOS Y APLICACIONES

Los inmunoensayos de Monobind son productos diseñados para trabajar en ambos ambientes de laboratorio Manual y Automatizado. AccuBind y AccuLite son compatibles con cualquier equipo abierto incluyendo analizadores químicos, lectores y lavadores de microplaca. Podemos tener la aplicación desarrollada para su equipo en particular, visite nuestra página en Internet.

Monobind ofrece varios instrumentos el Impuls 2 Luminómetro CLIA Lector de placa, diseñado mano a mano con nuestros productos y capacidad de 2 puntos de calibración. Visite nuestro sitio en Internet para mayor información.



Monobind Inc
100 North Pointe Drive
Lake Forest CA 92630 USA

Tel 949-951-2665

Fax: 949-951-3539

Email: info@monobind.com

En la web: www.monobind.com



IVD EC REP

2 °C 8 °C