

Ensayo inmunoenzimático por Quimioluminiscencia para la cuantificación de Triiodotironina de Captación en suero o plasma.

INTENCIÓN DE USO

Cuantificación de la cantidad total de sitios disponibles para las hormonas de tiroides en suero o plasma humano por inmunoanálisis en microplato de Quimioluminiscencia.

RESUMEN Y APLICACIÓN

La glándula tiroidea bajo el control regulador de la hormona tirotrópica secreta tiroxina (T4) y Triiodotironina (T3) dentro de la circulación general. Las hormonas liberadas que no circulan como moléculas libres pero son casi enteramente (99.9%) límite para las proteínas específicas del suero.

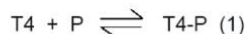
Tres fracciones de proteínas con variantes afines y capacidades para la interacción con T3 y T4 han sido identificadas por el papel de electroforesis de la corriente contraria. La globulina tiroxina obligatoria (TBG) acarrea 65~75% del total de la concentración en la circulación. La pre-albúmina tiroxina obligatoria (TBPA) tiene un aditivo intermedio para tiroxina (acarrea aprox. 15~25%) pero menos de cualquier aditivo para Triiodotironina. La albúmina con una afinidad baja pero alta capacidad acarrea 10% de tiroxina y 30% de la Triiodotironina. Los procesos metabólicos son regulados enteramente por la concentración de las hormonas tiroideas libres, que están relacionadas inversamente a los niveles de proteínas obligatorias, una determinación de la capacidad obligatoria de suero humano fue descubierta en 1957 por Hamolsky. En este periodo temprano, el T3 radioactivo fue agregado a un espécimen de sangre entera. Después de un periodo de incubación, la mezcla fue centrifugada y las células rojas lavadas. La reacción de captación de las células rojas fue relativamente inversa a la capacidad obligada del suero. A pesar de que este método tiene severas limitaciones, está probado que es una herramienta de diagnóstico muy valiosa. A futuro técnicas mejoradas en la metodología del análisis de la prueba de T3-captación resultado de varios agentes de separación tanto como carbón recubierto, resinas de ion-intercambio albúmina desnaturizada, silicatos, anticuerpos y polímeros orgánicos fueron empleados en lugar de las células rojas.

Esta metodología de inmunoanálisis por micro plato de Quimioluminiscencia provee el tecnicismo con sensibilidad óptima mientras se requiera pocas manipulaciones técnicas. En este método, la referencia del suero, espécimen-paciente, o control es agregado primeramente al pozo del micro plato. La enzima-T3 conjugada y la tiroxina son agregadas, y entonces los reactivos son mezclados. Las proteínas obligatorias endógenas de la muestra reaccionan con la tiroxina, pero no con la enzima conjugada. Esto conduce a un atascamiento más alto de la conjugación de la enzima al anticuerpo que combina sitios, reactivo para Triiodotironina y tiroxina, inmovilizada sobre los pozos como la capacidad del espécimen obligada del incremento.

Después de la complejación del periodo requerido de incubación, el anticuerpo etiquetado enzima-Triiodotironina conjugada es separado por aspiración o decantación. La actividad de la enzima presente sobre la superficie de los pozos es cuantificada por reacción con un sustrato conveniente para producir color. El empleo de varias referencias de suero de hormona tiroidea insaturada conocida obligada permite la capacidad de construcción de un gráfico de absorbancia y concentración. De la comparación de la curva de la reacción a cierta dosis, la actividad de un espécimen desconocido se puede correlacionar con la capacidad obligada de la hormona tiroidea.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

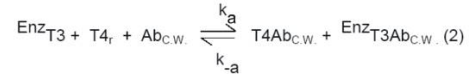
INMUNOANÁLISIS DE ENZIMA COMPETITIVA: Los componentes requeridos para la determinación de la capacidad obligada de suero humano son enzima T3 conjugada, tiroxina, proteína obligada (P), y anticuerpo inmovilizado de tiroxina (Ab). Una vez mezclada la enzima-conjugada y la tiroxina con el espécimen, una reacción obligada resulta entre las proteínas obligadas del paciente y la tiroxina agregada pero no con la enzima conjugada. Esta interacción está representada abajo:



T4=Tiroxina agregada (cantidad constante)

P = Proteínas Obligatorias Específicas (cantidad variable)

La tiroxina agregada (T4) no consumida en la reacción 1 entonces compete con la enzima-T3 conjugada para un número limitado de sitios obligados insolubilizados. La interacción está ilustrada en la siguiente ecuación:



Ab_{C.W.} = Anticuerpo Inmovilizado (Cantidad Constante)

T4_r = Agregado T4 sin actuar en reacción(1)(Cantidad Variable)

Enz_{T3} = Enzima-Antígena Conjugada (Cantidad Constante)

T4Ab_{C.W.} = Complejo Tiroxina-Anticuerpo

Enz_{T3} Ab_{C.W.} = Enzima-T3-Conjugada-Complejo Anticuerpo

k_a = Valor Constante de Asociación

k_{-a} = Valor Constante de Disociación

K = k_a / k_{-a} = Equilibrio Constante

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo-unido es separado del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-límite es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno. Así, en hipotiroidismo, las proteínas obligadas son relativamente insaturadas (debido al bajo nivel de hormonas tiroideas) resultando de la alta consumición de la tiroxina agregada. Esto lleva a una obligación mayor de la enzima-Triiodotironina conjugada causada por la concentración reducida de la tiroxina disponible. En hipertiroidismo, la reversa es verdad. Las proteínas atadas son saturadas relativamente con tiroxina (debido al nivel alto de hormona tiroidea) resultando en un consumo de la tiroxina agregada. La tiroxina sobrante es relativamente mayor que un espécimen eutiroides resultando en un bajo anticuerpo atado de enzima-antígeno debido a la incremento de competencia de la tiroxina por los sitios limitados del anticuerpo.

MATERIALES SUMINISTRADOS

A. REFERENCIAS DE SUERO HUMANO - 1ml/vial - Frascos A-D

Cuatro frascos de referencia del suero para hormona tiroidea insaturada de capacidad obligada en **aproximadamente*** niveles de 18(A), 25(B), 35(C), y 47(D) %U. Almacene entre 2-8°C. Se ha agregado un preservativo.

* Niveles exactos son dados en las etiquetas sobre un lote base específico.

B. TRAZADOR REACTIVO ENZIMA T3 U-1.5ml/ icono

Un frasco de Triiodotironina peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada y tiroxina en una matriz albumina-estabilizadora. Almacene entre 2-8°C.

C. TRAZADOR T3-U SOLUCIÓN -13ml-Icono

Un bote de reactivo conteniendo solución, tinte naranja y preservativo. Almacénese entre 2-8°C.

D. POZOS DE REACCION A LA LUZ - 96 pozos – icono

Un microplato de 96 pozos cubierto con suero anti-tiroxina de oveja y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénese entre 2-8°C.

E. SOLUCIÓN LAVADORA - 20ml icono

Un frasco que contiene surfactante en solución salina. Un preservativo se ha agregado. Almacénese entre 2-30°C.

F. REACTIVO SEÑAL A -7ml/frasco icono S^A

Un frasco que contiene luminol y una solución. Almacénese entre 2-8°C.

G. REACTIVO SEÑAL B -7ml/frasco icono S^B

Un frasco que contiene peróxido de hidrogeno (H₂O₂) en solución. Almacénese entre 2-8°C.

H. INSTRUCCIONES DEL PRODUCTO.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta días cuando están almacenados entre 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipeta capaz de entregar los volúmenes de 25µl con una precisión de mejor que 1.5%. 2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.350ml con una precisión de mejor de 1.5%.
2. Volumen ajustable (20-200µl) y (200-1000µl) dispensador(es) para la diluciones de conjugado y sustrato.
3. Lavador de Micro placas o una botella de apretón (opcional).
4. Luminómetro de Microplaca.
5. Tubos de ensayo para dilución de enzima conjugada y reactivos de señal A y B.
6. Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos del microplacas.
7. Plástico envolvente o tapa para el microplacas para los pasos de la incubación.
8. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
9. Contador de tiempo.
10. Materiales del control de calidad.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los especímenes deben ser sangre, suero en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras de veni-puntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo liso de veni-puntura de tapón rojo sin aditivos o barrera de gel. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **AGENTE DE TRABAJO A – T3U-SOLUCIÓN TRAZADOR ENZIMA.** Diluya el trazador reactivo de la enzima T3U 1:11 Solución T3 Captación conjugada en un contenedor adecuado. Por ejemplo, diluya 160µl de conjugada con 1.6ml de solución en 16 pozos (retire el exceso de solución). Este reactivo debe de ser usado dentro de las siguientes 24 horas para un máximo rendimiento en el análisis. Almacénese entre 2-8°C.
Fórmula General: Cantidad de solución requerida = Numero de pozos * 0.1 Cantidad necesaria de Enzima T3 = # de pozos 0.01 i.e.= 16x0.1 = 1.6ml para un total de T3/T4 solución conjugada. 16x0.01=0.16ml (160µl) para enzima conjugada T3.
2. **SOLUCIÓN LAVADORA.** Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. Almacénese a temperatura ambiente entre los 20-27°C. Por no más de 60 días.
3. **SOLUCIÓN DE TRABAJO REACTIVO DE SEÑAL.** Determine la cantidad de reactivo que necesite y prepare mezclando porciones iguales de Reactivo de señal A y Reactivo de Señal B en un contenedor limpio. Por ejemplo, añada 1 ml de A y 1 ml de B por dos (2) tiras de ocho pozos (se crea un exceso leve de solución) **Deseche la porción sin usar si es que no la usa dentro de las siguientes 36 horas.** Si la utilización completa de los reactivos se anticipa, dentro del tiempo establecido, vierta los contenidos del Reactivo de Señal A en el del Reactivo de Señal B y etiquete acordemente.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C).

1. Ajuste a formato los pozos de los micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. Guarde los micro pozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela entre 2-8°C.
2. Mida con una pipeta 0.025 ml (25 µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.
3. Agregue 0.100 ml (100 µl) de la solución de trabajo del reactivo 1, trazador de enzima T3U en todos los pozos.
4. Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar y cubrir.
5. Incube 45 minutos en la temperatura ambiente.
6. Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.
7. Agregue 350 µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspírelo. Repita cuatro veces adicionales para un total de cinco lavadas. Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga las instrucciones del fabricante para un uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita cuatro veces adicionales.

8. Agregue 0.100 ml (100 µl) de solución de señal reactiva de trabajo a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.
9. Incube por cinco minutos en la oscuridad.
10. Lea las Unidades Relativas de Luz (RLU's) en cada pozo usando un Luminómetro de micro plato. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta minutos de agregar la solución de paro.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Una curva en la reacción se usa para comprobar la capacidad de instauración tiroidea obligada en especímenes desconocidos.

1. Registre los RLU's obtenida de la impresora del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
2. Trace los RLU's para cada referencia duplicada del suero contra la correspondiente de %T3-Captación (%U) en el papel de gráfico lineal. (No promedie los duplicados de referencias del suero antes de trazar).
3. Dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
4. Para determinar el porcentaje de T3 captación para un desconocido, localice la absorbencia media de los duplicados para cada desconocido en el eje del gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y lea el % de T-captación (%U) del eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, el promedio de RLU 42201 (intercepta la curva de reacción en 30.8%U

VALORES DE REFERENCIA

Un estudio de adultos eutiroides aparentemente normales (85 especímenes) fue tomado para determinar valores previstos para la T-Captación y presentados en la Tabla 1.

TABLA 1
Valores Esperados para el Sistema de Prueba por ELISA de T-captación.

Estado Tiroides	%T-Captación	T-Cociente
Eutiroides	25-35	0.83-1.17
Hipotiroides o TBG obligada	<25	<0.83
[Hipotiroides o TBG saturada	<35	<1.17

Es importante mantener en mente que el establecimiento del rango de valor el cual se espera encontrarse por un método dado por una población de personas "normales" es dependiente a la multiplicidad de factores: la especificidad de los métodos, la población analizada y la precisión de los métodos en manos de los analistas. Por esta razón cada laboratorio debe depender del rango esperado de valores establecidos por el fabricante solo hasta un rango interior que puede ser determinado por el analista usando el método con una población indígena al área en el que el laboratorio está ubicado.

PERFORMANCE

1. Precisión: La precisión dentro y entre el análisis de la prueba de T3-captación por sistema de CLIA fue determinada por análisis en tres diferentes niveles de suero de control de la piscina. El número (N), valor principal(X), desviación Standard (σ) y coeficiente de variación (C.V.)

2. Exactitud: La prueba de T-captación por CLIA, fue comparada con método de Inmunoanálisis de enzima. Especímenes biológicos de hipotiroides, eutiroides e hipertiroide poblacionales fueron usados (Valores de Rango de 15% – 45%U). El número total de cuyos especímenes fue de 120. La última ecuación de regresión del último cuadro y el coeficiente de correlación fue computada por la T-Captación Chemi en comparación con el método de referencia.

Distribuido por:
Grupo Industrial MexLab S.A. de C.V.
01800-111-4343
www.grupomexlab.com