

Free T3



Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Notice d'utilisation / Instrucciones de uso

English	2
Français	7
Español	12
Bibliography / Bibliographie / Bibliografía	18
Abbreviations / Abréviations / Abreviaciones	18
Packaging materials/ Matériels d'emballage/ Materiales de embalaje	18
Symbols Key / Explication des symboles / Símbolos	19
Summary of Test Procedure / Résumé de la procédure de test / Resumen de la técnica	20

REF

DNOV051 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

The thyroid hormone, triiodothyronine (T3), is produced by the thyroid gland. An important component in the synthesis is iodine. Thyroxine is converted to the active T3 (three to four times more potent than T4) within cells by deiodinases (5'-iodinase).

Thyroxine-binding globulin (TGB) is the major carrier protein for circulating thyroid hormone.

Only a very small fraction of the circulating hormone is free (unbound) 0.3%; this fraction is biologically active. Thus, measurements of free triiodothyronine concentrations correlate more reliably with clinical status than total triiodothyronine levels. For example, the increase in total triiodothyronine levels associated with pregnancy, oral contraceptives and oestrogen therapy result in higher total T3 levels while the free T3 (FT3) concentration remains basically unchanged.

The concentrations of the carrier proteins are altered in many clinical conditions, such as pregnancy. In normal thyroid function as the concentrations of the carrier proteins alters, the total triiodothyronine level changes so that the free triiodothyronine concentration remains constant.

The binding of T3 plays a key role in the feedback control of the thyroid, with FT3 acting on the pituitary to inhibit thyroid hormone secretion.

The thyronines act on the body to increase the basal metabolic rate, affect protein synthesis and increase the body's sensitivity to catecholamine (such as adrenaline) by permissiveness. The thyroid hormones are essential to proper development and differentiation of all cells of the human body. These hormones also regulate protein, fat, and carbohydrate metabolism, affecting how human cells use energetic compounds. Numerous physiological and pathological stimuli influence thyroid hormone synthesis. Thyrotoxicosis or hyperthyroidism is the clinical syndrome caused by an excess of circulating free thyroxine, free triiodothyronine, or both.

Both T3 and T4 are used to treat thyroid hormone deficiency (hypothyroidism).

Since conditions such as pregnancy, oestrogen therapy and other non-thyroid factors alter TBG concentrations, assessment of thyroid function through total T3 measurement may result in an erroneous diagnosis, because FT3 levels, are unaffected by binding protein changes.

2. INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free T3 (Triiodothyronine) in human serum or plasma from an adult population.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

Microtiter strip wells are precoated with anti-T3 antibodies (solid phase). T3 in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled T3 (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation a bound/free separation is performed by solid-phase washing. The immune complex formed by enzyme-labelled antigen is visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is **inversely** proportional to the amount of T3 in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorption at 450 nm is read using an ELISA microwell plate reader.

FT3 concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-T3; in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 mol/l (avoid any skin contact).
- **Conjugate:** 1 bottle containing 12 ml of horseradish peroxidase labelled T3.
- **Wash Solution 50x conc.:** 1 bottle containing 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween-20 55 g/l); contains < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (avoid any skin contact); contains ≤ 0.0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Standards:** 6 bottles, 1 ml each
 - Standard 0: 0.0 pg/ml
 - Standard 1: 1.5 pg/ml
 - Standard 2: 3.1 pg/ml
 - Standard 3: 5.4 pg/ml
 - Standard 4: 8.5 pg/ml
 - Standard 5: 19.0 pg/ml

Exact concentrations are given on the labels on a lot specific basis.

For SI units: 1pg/ml x 1.536 = pmol/l.

For hazard and precautionary statements see 13.1.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foils
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA microwell plate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450 nm, 620-630 nm
- Manual or automatic equipment for rinsing wells
- Vortex tube mixer

- Distilled water
- Disposable tubes
- Timer

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored in the original vial at 2...8 °C in the dark.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28°C) for at least 30 minutes before starting the test run! At the end of the assay, store all reagents immediately at 2-8° C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Microtiterplate

The ready to use break apart snap-off strips are coated with anti-T3 IgG antibodies. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. *Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.*

6.2. Conjugate

The T3-HRP conjugate is ready to use.

6.3. Wash Solution

Dilute concentrated Wash Solution to 1000 ml with distilled or deionised water in a suitable storage container. For smaller volumes respect the 1:50 ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2...8°C.

6.4. Standards

The standards are ready to use. Once opened the standards are stable for another 6 months at 2...8°C.

6.5. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8°C in the dark. *The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.*

6.6. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution. This ready to use solution has to be stored at 2...8°C.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Specimen(s) may be refrigerated at 2...8°C for a maximum period of 48 hours. If the specimen(s) cannot be assayed within 48 hours, the sample(s) may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing of the samples.

When assayed in duplicate, 0.100 ml of the specimen is required.

7.1. Precaution

- Avoid the exposure of TMB substrate to direct sunlight, metal or oxidants. Do not freeze the solution.
- Maximum precision is required for dispensation of the reagents.

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the test instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve. Please allocate at least:

2 wells (e.g. A1+B1)	for standard 0
2 wells (e.g. C1+D1)	for standard 1
2 wells (e.g. E1+F1)	for standard 2
2 wells (e.g. G1+H1)	for standard 3
2 wells (e.g. A2+B2)	for standard 4
2 wells (e.g. C2+D2)	for standard 5

It is necessary to determine standards and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

1. Dispense 50 µl standards and samples into their respective wells.
2. Add 100 µl T3-HRP Conjugate to each well.
3. Swirl the microplate gently for 20 – 30 sec to mix and cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour at room temperature (22...28°C).**
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl diluted Wash Solution. Avoid overflows from the reaction wells.

Important Note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

6. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (22...28°C) in the dark.**
8. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Mix gently for 15 – 20 sec.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
9. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **standard 0**.

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. RESULTS

9.1. Calculation of results

Calculate the mean absorbance for each point of the standard curve and each sample. Plot the mean value of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (e.g. Four Parameter Logistic).

Interpolate the values of the samples on the standard curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/ml.

9.2. Reference values

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for the Free T3 EIA Test System.

	Mean (pg/ml)	SD	Range (pg/ml)
Adult	2.8	0.7	1.4 – 4.2
Pregnancy	3.0	0.6	1.8 – 4.2

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore, each laboratory should consider the range given by the manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at levels in the hypothyroid, euthyroid and hyperthyroid range for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid, and samples must be retested.

11. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The results refer to the groups of samples investigated; these are not guaranteed specifications.

11.1. Precision

Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate determination (24x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 4.94 %.

Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different control sera in different lots. The between assay variability is ≤ 13.19 %.

11.2. Cross Reactivity

The cross reactivity of the Triiodothyronine antibody to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between doses of interfering substance to dose of Triiodothyronine needed to displace the same amount of tracer.

Substance	Concentration	Cross Reactivity
I-Triiodo-thyronine	-	1.0000
I-Thyroxine	10 µg/ml	< 0.0002
d-Thyroxine	10 µg/ml	< 0.0001
Iodo-thyrosine	10 µg/ml	< 0.0001
Diodo-thyrosine	10 µg/ml	< 0.0001
Triiodothyroacetic Acid	10 µg/ml	< 0.0001
Phenylbutazone	10 µg/ml	< 0.0001
Sodium Salicylate	10 µg/ml	N/D
Phenytoin	10 µg/ml	N/D
Oleic Acid	10 nmol/l	N/D
Albumin	50 mg/ml	N/D
Hemoglobin	10 µl/ml of packed red cells added to the serum	N/D

11.3. Analytic Sensitivity

The lowest detectable concentration of free T3 that can be distinguished from the standard 0 is 0.05 pg/ml at the 95 % confidence limit.

11.4. Interferences

- Several drugs are known to influence the binding of Triiodothyronine to the thyroid hormone carrier proteins or the metabolism to T3 and complicate the interpretation of free T3 assay results.
- Circulating autoantibodies to T3 and hormone-binding inhibitors may interfere.
- Heparin has been reported to have in vivo and in vitro effects on free T3 concentration. Therefore, do not use samples in which this anti-coagulant has been used.
- In severe nonthyroidal illness (NTI), the assessment of thyroid status becomes very difficult. TSH measurements are recommended to identify thyroid dysfunction.
- Familial dysalbuminemic conditions may yield erroneous results on direct T3 assays.
- **Not intended for newborn screening.**

11.5. Method comparison

The Free T3 ELISA was compared to another commercially available free T3 assay. 151 serum samples were analysed according in both test systems. The linear regression curve was calculated:

$$(\text{Free T3 ELISA}) = 0.923 * (\text{FT3 RIA}) + 0.350$$

$$r^2 = 0.903$$

12. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

"NOT INTENDED FOR NEWBORN SCREENING"

13. PRECAUTIONS AND WARNINGS


- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- Only for in-vitro diagnostic use by professional persons. Not for internal or external use in humans or animals.
- When using automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested. To improve the performance of the kit on ELISA automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- All components of human origin used for the production of these reagents have been tested for anti-HIV antibodies, anti-HCV antibodies and HBsAg and have been found to be non-reactive. Nevertheless, all materials should still be regarded and handled as potentially infectious.
- Do not interchange reagents or strips of different production lots.
- No reagents of other manufacturers should be used along with reagents of this test kit.
- Do not use reagents after expiry date stated on the label.
- Use only clean pipette tips, dispensers, and lab ware.
- Do not interchange screw caps of reagent vials to avoid cross-contamination.
- Close reagent vials tightly immediately after use to avoid evaporation and microbial contamination.
- After first opening and subsequent storage check conjugate and control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense conjugate without splashing accurately to the bottom of wells.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Some reagents contain small amounts of CMIT/MIT as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- The ELISA is only designed for qualified personnel who are familiar with good laboratory practice.

13.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) (refer to 4.1)

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	Warning	H317	May cause an allergic skin reaction.
		P261	Avoid breathing gas/mist/vapours/spray.
		P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
		P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
		P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
		P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

13.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

14. ORDERING INFORMATION

REF	DNOV051	Free T3	(96 Determinations)
------------	---------	---------	---------------------

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

L'hormone thyroïdienne, la triiodothyronine (T3), est produite par la thyroïde. L'iode est un composant important de la synthèse. La thyroxine est convertie en T3 active (trois à quatre fois plus puissante que la T4) à l'intérieur des cellules par les deiodinases (5'- iodine).

La globuline transportant la thyroxine (TGB) est la protéine porteuse de l'hormone thyroïdienne circulante.

Seule une fraction très petite de l'hormone circulante est libre, à 0,3 % (non liée) ; cette fraction est biologiquement active. La mesure de la concentration libre de triiodothyronine est donc en corrélation avec l'état clinique plutôt qu'avec les taux totaux de triiodothyronine. Par exemple, l'augmentation des taux totaux de T3 est associée à la grossesse, aux anticonceptionnels par voie orale et aux traitements aux œstrogènes ; elle entraîne des taux élevés de T3 totale tandis que la concentration de T3 libre reste inchangée.

La concentration en protéines porteuses est altérée dans de nombreux cas, comme par exemple en cas de grossesse. Lorsque la fonction thyroïdienne est normale, l'altération des concentrations en protéines porteuses fait varier la concentration totale de T3 tandis que la fraction libre reste constante.

La liaison du T3 joue un rôle fondamental dans le contrôle de retour de la thyroïde: la T3 libre (FT3) agit sur l'hypophyse afin d'inhiber la sécrétion de l'hormone thyroïdienne.

Les hormones thyroïdiennes agissent sur l'organisme de façon à augmenter le métabolisme basal, elles affectent la synthèse protéique et elles augmentent la sensibilité du corps aux catécholamines (comme l'adrénaline). Les hormones thyroïdiennes sont essentielles au développement et à la différenciation des cellules du corps humain. Ces hormones régulent de plus le métabolisme des protéines, des graisses et des carbohydrates ; elles sont impliquées dans la régulation de l'utilisation des résidus énergétiques de la part des cellules. Les stimuli physiologiques et pathologiques influencent la synthèse de l'hormone thyroïdienne. Un excès de T3 circulante provoque le syndrome clinique de la thyrotoxicose ou hyperthyroïdie. Tant la T3 que la T4 servent au traitement de l'hypothyroïdie. Certaines conditions cliniques comme la grossesse, un traitement aux œstrogènes et d'autres facteurs indépendants de la thyroïde, altèrent les concentrations de TGB et la mesure des taux de FT3 et pourraient entraîner un diagnostic erroné du fait que les taux de FT3 résultent inaltérés aux changements de la TGB.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de la triiodothyronine libre (FT3) dans le sérum ou le plasma humain d'une population adulte.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La triiodothyronine libre (FT3, antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec le T3 antigénique marqué à la peroxydase de raifort (HRP) par rapport à l'anticorps anti T3 adsorbé sur microplaque (phase solide). Après de la incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme HRP présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H_2O_2) et le substrat TMB, en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H_2SO_4). L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration de FT3 dans l'échantillon. La concentration de FT3 dans l'échantillon est calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

La concentration de FT3 dans l'échantillon est calculée à l'aide d'une courbe d'étalonnage.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage** : 12 bandes détachables enduites d'Anti-T3 de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué** : 1 flacon contenant 12 ml de T3 marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de lavage (concentrée x 50)** : 1 flacon contenant 20 ml (NaCl 45 g/l; Tween-20 55 g/l) ; contient < 0,06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26 g/L) (éviter tout contact avec la peau) ; contient \leq 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Etalons** : 6 flacons, 1 ml chacun
 - Etalon 0: 0,0 pg/ml
 - Etalon 1: 1,5 pg/ml
 - Etalon 2: 3,1 pg/ml
 - Etalon 3: 5,4 pg/ml
 - Etalon 4: 8,5 pg/ml
 - Etalon 5: 19,0 pg/ml

Les taux exacts sont rapportés dans les étiquettes pour chaque lot spécifique.

Pour les unités SI : 1 pg/ml x 1,536 = pmol/l

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 13.1

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollant
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes. À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Plaque de Microtitrage

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps anti-T3 et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué

Solution de conjugué T3-HRP prête à l'emploi.

6.3. Solution de lavage

Diluer la solution de lavage concentrée à 1000 ml d'eau distillée ou désionisée dans un récipient adapté. Pour de plus petits volumes, respecter le ratio de 1:50. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8°C.

6.4. Etalons

Les étalons sont prêts à l'emploi. Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.5. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M. Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons peuvent être réfrigérés à 2...8°C pendant une période maximale de 48 heures. Le conserver jusqu'à 30 jours à -20° C s'il ne peut pas être testé dans les 48 heures. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons. Pour des tests en double, 0,10 mL d'échantillon sont nécessaires.

7.1. Précaution

- Eviter l'exposition du TMB au rayon du soleil, aux métaux et aux oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Un maximum de précaution est nécessaire pour l'utilisation des réactifs.

8. PROTOCOLE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. Avant de commencer le dosage, déterminer le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et placer les sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter des résultats faussés. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

2 puits (ex. A1+B1)	Pour l'étalon 0
2 puits (ex. C1+D1)	Pour l'étalon 1
2 puits (ex. E1+F1)	Pour l'étalon 2
2 puits (ex. G1+H1)	Pour l'étalon 3
2 puits (ex. A2+B2)	Pour l'étalon 4
2 puits (ex. C2+D2)	Pour l'étalon 5

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 50 µl d'étalons et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 100 µl de conjugué à la T3-HRP dilué dans chaque puits.
3. Agiter délicatement la microplaque pendant 20-30 secondes et couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à température ambiante (22°C – 28°C).**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante : pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22°C – 28°C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque (15 – 20 sec).
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Lisez l'absorbance (E) à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le Blanc au cours de 5 minutes.

8.2. 8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide de l'étalon 0

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon.

Il est recommandé d'utiliser une longueur d'onde de référence à 620 nm pour la lecture à double longueur d'onde.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaires.

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur le courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Une étude de population adulte euthyroid a été utilisée pour déterminer les valeurs prévues pour le coffret ELISA FT3.

	Moyenne (pg/ml)	SD	Plage (pg/ml)
Adultes	2,8	0,7	1,4 – 4,2
Grossesse	3,0	0,6	1,8 – 4,2

Il est important de noter que la détermination d'une gamme de valeurs attendues dans une méthode donnée pour une population de «normal» est tributaire de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode en usage, et la population étudiée. Par conséquent, chaque laboratoire devrait examiner la gamme spécifiée par le fabricant comme un guide général et de produire leur propre gamme de valeurs attendues sur la base des laboratoires où la population autochtone habite

10. CONTROLE QUALITÉ

Chaque laboratoire devrait tester les contrôles avec des taux d'hypothyroïdie, d'euthyroid et d'hyperthyroïdie pour surveiller les performances du coffret. Ces contrôles doivent être traités comme inconnus et les valeurs déterminées dans chaque session.

Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées doivent, de plus, être utilisées pour vérifier la tendance. Chaque laboratoire devrait choisir les limites d'acceptabilité des performances du coffret. Les autres paramètres incluent les interceptions à 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage pour la reproductibilité inter-essai. De plus, l'absorbance maximale devrait refléter les valeurs des séances précédentes. Des déviations significatives par rapport aux prestations établies peuvent indiquer une altération inobservée des conditions expérimentales ou une dégradation des réactifs du coffret. Utiliser des réactifs frais pour déterminer les motifs des variations.

Pour que les résultats de l'analyse soient considérés comme valables, les étalons du kit doivent être conformes aux spécifications indiquées dans le *Certificate of Analysis (CoA)* spécifique au lot.

Si un contrôle se situe en dehors de la plage spécifiée, les résultats du test associé ne sont pas valables et les échantillons doivent être testés à nouveau.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (24x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 4,94$ %.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure (12x) de trois sérums de contrôle différents en lots différents. La variation inter dosage est $\leq 13,19$ %.

11.2. Spécificité analytique

La réactivité croisée de l'anti-triiodothyronine avec certaines substances a été déterminée en ajoutant les solutions interférentes à une matrice de sérum à diverses concentrations. La réactivité croisée a été calculée en analysant le rapport entre la concentration de substances interférentes et la concentration de triiodothyronine nécessaire pour déplacer la même quantité de conjugué.

Substance	Concentration	Réactivité croisée
I-triiodothyronine	-	1,0000
I-Thyroxine	10 µg/ml	< 0,0002
d-Thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Iodo-thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Diodo-thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Acide triiodothyroacétique	10 µg/ml	< 0,0001
Phénylbutazone	10 µg/ml	< 0,0001
Salicylate de sodium	10 µg/ml	N/D
Phénytoïne	10 µg/ml	N/D
Acide oléique	10 nmol/LI	N/D
Albumine	50 mg/ml	N/D
Hémoglobine	10 µL/ml of pace red cells added to the serum	N/D

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de T3 libre par l'étalon 0 est 0,05 pg/ml avec une limite de confiance de 95%.

11.4. Interférences

- Divers médicaments peuvent agir sur la liaison entre la triiodothyronine et les protéines porteuses ou sur le métabolisme de la T3, ce qui complique l'interprétation des résultats de la T3 libre.
- Les autoanticorps circulants vers la T3 et les inhibiteurs liant les hormones peuvent provoquer des interférences.
- La littérature spécialisée rapporte que l'héparine a des effets in vivo et in vitro sur la concentration de FT3. Aucune épreuve n'a toutefois été réalisée avec des échantillons contenant cet anticoagulant.
- Dans plusieurs maladies non thyroïdiennes (NTI), il devient très difficile d'établir l'état de la thyroïde. La mesure du TSH est recommandée pour repérer les anomalies de fonctionnement de la thyroïde.
- Des dysalbuminémies familiales peuvent induire des résultats erronés dans la détermination directe du dosage de la FT3.
- « NE PAS UTILISER AUX FINS DU DÉPISTAGE CHEZ LES NOUVEAUX-NÉS »

11.5. Comparaison de méthode

L'ELISA de T3 libre (Free T3) a été comparé à un coffret disponible en commerce. 151 échantillons de sérum ont été testés. La courbe de régression est :

$$(\text{Free T3}) = 0,923 * (\text{FT3 RIA}) + 0,350$$

$$r^2 = 0,903$$

12. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

« NE PAS UTILISER AUX FINS DU DÉPISTAGE CHEZ LES NOUVEAUX-NÉS »

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.

- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Éviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Éviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de CMIT/MIT comme conservateur. Éviter le contact avec la peau ou les muqueuses.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés, fortement lipémiques, ictériques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés dans le test.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.
- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit constant pour la reproductibilité. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse dans chaque plaque.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- La méthode ELISA est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

13.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 4.1).

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention



H317	Peut provoquer une allergie cutanée.
P261	Éviter de respirer les aérosols.
P280	Porter des gants de protection/ des vêtements de protection.
P302+P352	EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: Laver abondamment savon à l'eau.
P333+P313	En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362+P364	Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

13.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF

DNOV051

Free T3

(96 Déterminations)

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

La hormona tiroidea, triyodotironina (T3), es producida por la glándula tiroidea. Un componente importante en su síntesis es el yodo. La tiroxina se convierte en la T3 activa (de tres a cuatro veces más potente que la T4) dentro de las células por deiodinasas (5'-iodinase).

La globulina fijadora de tiroxina (TGB) es la proteína transportadora más importante para la circulación de la hormona tiroidea. Sólo una fracción muy pequeña de la hormona circulante es libre (no unida) 0,3%, esta fracción es biológicamente activa. Por lo tanto, las mediciones de la concentración de triyodotironina libre se correlacionan más fiablemente con el estado clínico que con los niveles de triyodotironina total. Por ejemplo, el aumento en los niveles de triyodotironina está asociado con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia estrógena resulta niveles más altos de T3 total, mientras que la concentración de T3 libre (T3L) se mantiene básicamente sin cambios.

Las concentraciones de las proteínas transportadoras se alteran en muchos cuadros clínicos, tales como el embarazo. En la función tiroidea normal, los niveles de las proteínas transportadoras alteran, los niveles de triyodotironina total cambian de nivel para que la concentración de la triyodotironina libre se mantenga constante

La unión de T3 juega un papel clave en el control de retroalimentación de la tiroidea, con T3L que actúan sobre la hipófisis, inhibiendo la secreción de las hormonas tiroideas.

La acción de las tiroxinas en el cuerpo es aumentar la velocidad metabólica basal, afecta la síntesis de proteínas y aumenta la sensibilidad del organismo a las catecolaminas (como la adrenalina) por la permisividad. Las hormonas tiroideas son esenciales para el adecuado desarrollo y diferenciación de las células del cuerpo humano. Estas hormonas también regulan proteínas, grasas, y el metabolismo de los carbohidratos, afectan la manera en que las células humanas usan compuestos energéticos. Numerosos estímulos fisiológicos y patológicos influyen en la síntesis de hormona tiroidea.

La tirotoxicosis o hipertiroidismo es el síndrome clínico causado por un exceso de circulación de tiroxina libre, triyodotironina libre, o ambas.

Ambas, T3 y T4 se utilizan para tratar la deficiencia de la hormona tiroidea (hipotiroidismo).

Dado que las condiciones como el embarazo, la terapia con estrógenos y otros factores no tiroideos alteran las concentraciones de TBG, evaluación de la función tiroidea mediante la medición de T3 total pueden dar lugar a un diagnóstico erróneo, ya que los niveles de T3L, se ven afectados por cambios en las proteínas de unión.

2. USO

Método inmunoenzimático competitivo y colorimétrico para la determinación cuantitativa de T3 libre (triyodotironina) en suero o plasma humano de una población adulta.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

Los pozos de microtitulación de las tiras se encuentran recubiertos con anticuerpos anti -T3 (fase sólida). La T3 en la muestra compete por la unión a estos anticuerpos con T3 marcada con peroxidasa de rábano picante (antígeno marcado con enzima). Una vez finalizada la incubación, se lleva a cabo una separación del complejo unido/libre mediante el lavado de la fase sólida. El complejo inmune formado por el antígeno marcado con enzima se visualiza mediante la adición de tetrametilbencidina (TMB), la cual produce un producto de reacción azul. La intensidad de este producto es **inversamente** proporcional a la cantidad de T3 presente en la muestra. El ácido sulfúrico se agrega para detener la reacción. Esto produce un color amarillo de punto final. La absorción a 450 nm se lee con un lector de microplacas de ELISA.

La concentración de FT3 en la muestra se calcula según una curva de calibración.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-T3 y vienen empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial que contiene 15 mL de ácido sulfúrico 0,15 mol/l (evitar cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado:** 1 vial que contiene 12 mL de T3 marcada con peroxidasa de rábano.
- **Solución de lavado 50x conc.:** 1 vial que contiene 20 ml (NaCl 45 g/l, Tween-20 55 g/l); contiene < 0.06 % (v/v) CMIT/MIT (3:1)
- **Solución sustrato TMB:** 1 botella contiene 15 mL 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0,26 g/L) (evitar cualquier contacto con la piel); contiene ≤ 0,0015 % (v/v) CMIT/MIT (3:1).
- **Estándares:** 6 botellas, 1 ml cada una, aprox:
 - Estándar 0: 0,0 pg/ml
 - Estándar 1: 1,5 pg/ml
 - Estándar 2: 3,1 pg/ml
 - Estándar 3: 5,4 pg/ml
 - Estándar 4: 8,5 pg/ml
 - Estándar 5: 19,0 pg/ml

Los niveles exactos se especifican en las etiquetas para cada uno de los lotes.

Para las unidades del SI: 1pg/ml x 1,536 = pmol /l.

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 13.1

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Lector de de ELISA equipado para medir absorbancia a 450 nm, 620-630 nm
- Equipo manual o automático para el lavado de los pozos
- Vórtex para mezclar los tubos
- Agua destilada
- Tubos desechables
- Temporizador

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan en los frascos originales a 2...8 °C en oscuridad.

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que tenga todos los reactivos, muestras y patrones a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2 – 8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-T3. Se deben conservar a una temperatura de entre 2...8 °C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. *Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable junto con el desecante suministrado y almacenarla a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.*

6.2. Conjugado

El conjugado T3-HRP está listo para su uso.

6.3. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada en un 1000 ml con agua destilada o desionizada usando un contenedor adecuado. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar la relación de 1:50. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2...8 °C.

6.4. Estándares

Los estándares están listos para ser usados. Los estándares abiertos son estables por 6 meses cuando se almacenan a 2...8 °C.

6.5. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo está listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. *La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.*

6.6. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 M. Esta solución está lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La muestra(s) puede ser refrigerada a una temperatura de entre 2...8 °C (por un período máximo de 48 horas). Si la muestra(s) no puede ser analizada dentro de las siguientes 48 horas, ésta puede ser almacenada a -20 °C por un máximo de 30 días.

Se requieren 0.100 ml de muestra para realizar el análisis por duplicado. Evite realizar ciclos repetidos de congelación y descongelación.

7.1. Precauciones

- Evitar la exposición del sustrato TMB a la luz solar directa, metal u oxidantes. Non congelar la solución.
- La máxima precisión es necesaria al momento de dispensar los reactivos.

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación para la prueba

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo antes de realizar el ensayo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar la deriva del análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta. Por favor, destinar al menos:

2 pozos (por ejemplo, A1+B1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, C1+D1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, E1+F1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, G1+H1)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, A2+B2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, C2+D2)	para el estándar 5

Es necesario determinar los estándares y muestras de pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

1. Agregue 50 µl de estándares y muestras en sus respectivos pozos. Deje el pozo A1 libre para el blanco del sustrato.
2. Agregue 100 µl de conjugado T3-HRP a cada pozo excepto al pozo destinado para el blanco.
3. Mezclar la microplaca suavemente de 20 a 30 segundos, para mezclar cubrir los pozos con la lámina autoadhesiva suministrado en el kit.
4. **Incube durante 1 hora a temperatura ambiente (22...28 °C).**
5. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción.
Note importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automáticos: Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

6. Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB en todos los pozos.
7. Incube durante exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.
8. Agregue 100 µl de solución de parada en todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad que agregó la solución de sustrato TMB.
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.
9. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Lectura

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a **cero** usando el **estándar 0**.

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

Cuando sea necesario, calcule el **valor medio de las absorbancias** de los duplicados.

9. RESULTADOS

9.1. Cálculo de los resultados

Calcule la absorbancia media para cada punto de la curva estándar y cada muestra. Grafique el valor medio de absorbancia de los estándares versus la concentración. Dibuje la curva que mejor se ajuste a los puntos trazados (Ej.: Logística de cuatro parámetros). Interpole los valores de las muestras en la curva estándar para obtener los valores correspondientes para las concentraciones expresadas en pg/l.

9.2. Valores de referencia

Se realizó un estudio en población de adultos eutiroideos para determinar los valores esperados para el sistema inmnoenzimático para la determinación de T3 libre.

	Media (pg/ml)	SD	Rango (pg/ml)
Adulto	2.8	0,7	1.4 – 4.2
Embarazo	3.0	0.6	1.8 -- 4.2

Por favor prestar atención al hecho de que la determinación de un rango de valores esperados para una población "normal" en un método dado, depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método utilizado y el tipo de población que se investiga. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el rango indicado por el fabricante como una indicación general y producir su propio rango de valores esperados basados en la población local del laboratorio que lo usa.

10. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe evaluar controles que correspondan a niveles dentro del rango de hipotiroidismo, hipertiroidismo y eutiroidismo para supervisar el desempeño del ensayo. Estos controles deben ser tratados como muestras desconocidas y se deben determinar sus valores cada vez que se realice el ensayo. Se deben llevar gráficas de éstos controles de calidad para hacerle seguimiento al desempeño de los reactivos. Se deben emplear los métodos estadísticos pertinentes para verificar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites aceptables de desempeño para el ensayo. Otros parámetros que se deben controlar son los interceptos al 80, 50 y 20% de la curva estándar para evaluar la reproducibilidad intercorrida. Además, la absorción máxima debe ser consistente con la experiencia del laboratorio. Una desviación significativa del desempeño establecido puede indicar un cambio en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos. Deben usarse reactivos frescos para determinar la razón de las variaciones.

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los estándares del kit deben estar dentro de las especificaciones detalladas en el *Certificate of Analysis (CoA)* específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de las pruebas asociadas no son válidos y las muestras deben volver a analizarse.

11. CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS DE DESEMPEÑO

Los resultados están basados en el grupo de pruebas investigado; no se trata de especificaciones garantizadas.

11.1. Precisión

Variación intraensayo

La variación intracorrida fue determinada por mediciones repetidas (24x) de tres sueros control diferentes en un mismo ensayo. La variación intracorrida del ensayo es $\leq 4.94\%$.

Variación interensayo

La variación intercorrida fue determinada por mediciones repetidas (12x) de tres sueros control diferentes con lotes distintos. La variabilidad interensayo es $\leq 13.19\%$.

11.2. Reactividad cruzada

La reactividad cruzada de los anticuerpos triyodotironina con sustancias seleccionadas fue evaluada agregando varias concentraciones de la sustancia interferente a evaluar a una matriz de suero. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre las dosis de la sustancia interferente con la dosis de tiroxina necesaria para desplazar la misma cantidad de trazador.

Sustancia	Concentración	Reactividad cruzada
I-Triyodo-tironina	-	1.0000
I-Tiroxina	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0002
d-Tiroxina	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0001
Yodo-tirosina	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0001
Diodo-tirosina	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0001
Ácido Triyodotetraacético	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0001
Fenilbutazona	10 $\mu\text{g/ml}$	<0.0001
Salicilato de sodio	10 $\mu\text{g/ml}$	N/D
Fenintoina	10 $\mu\text{g/ml}$	N/D
Acido oleico	10 nmol/l	N/D
Albumina	50 mg/ml	N/D
Hemoglobina	10 $\mu\text{g/ml}$ de paso de células rojas adicionadas al suero	N/D

11.3. Sensibilidad Analítica

La concentración detectable más baja de T3 libre que se puede distinguir del estándar 0 es 0,05 pg/ml con un límite de confianza del 95%.

11.4. Interferencias

- Existen varios medicamentos que influyen en la unión de la triyodotironina a las proteínas transportadoras de hormona tiroidea o el metabolismo de T3 y complican la interpretación de los resultados del ensayo de T3 libre.
- Autoanticuerpos circulantes de la hormona T3 y inhibidores de la unión - hormonas pueden interferir
- Se ha reportado que la heparina puede tener in vivo e in vitro efectos en la concentración de T3 libre. Por lo tanto, no utilizar muestras en que ha sido este anticoagulante utilizado.
- En la enfermedad no tiroidea grave (NTI), la evaluación del estado de la tiroides llega a ser muy difícil. Las mediciones de TSH se recomiendan para identificar la disfunción del tiroides.
- Condiciones familiares como la disalbuminémica, pueden dar resultados erróneos en los ensayos directos de T3.
- "NO DESTINADOS A LA INVESTIGACIÓN DEL RECIÉN NACIDO"

11.5. Método de comparación

El ensayo T3 Libre (Free T3 ELISA) fue comparado con otro ensayo de T3 libre disponible comercialmente. Se analizaron 151 muestras de suero de acuerdo a las instrucciones de sistemas de prueba. Se calculó la curva de regresión lineal

$$\text{(Free T3 ELISA)} = 0.923 * (\text{FT3 RIA}) + 0.350$$

$$r^2 = 0.903$$

12. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

"NO DESTINADO A LA INVESTIGACIÓN DEL RECIÉN NACIDO"

13. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No está autorizado realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Sólo para uso en diagnóstico in vitro por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.

- Todos los componentes de origen humano utilizados para la producción de estos reactivos han sido examinado para determinar la presencia de anticuerpos anti-VIH, anticuerpos anti-HCV y anticuerpos anti-HBsAg y se ha determinado que no son reactivos. Sin embargo, todo el material debe ser considerado y tratado como potencialmente infeccioso.
- No intercambiar reactivos o tiras de diferentes lotes de producción.
- No se deben utilizar reactivos de otros fabricantes en combinación con los reactivos de este kit.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.
- Use sólo puntas para micropipeta, dispensadores y material de laboratorio limpio.
- No intercambie las tapas de los viales. Esto evita la contaminación cruzada.
- Cierre los viales de los reactivos con fuerza inmediatamente después de usarlos para evitar la evaporación y contaminación microbiana.
- Después de abrir el kit por primera vez y almacenarlo, verifique que los viales del conjugado y los estándares no presenten contaminación microbiana antes continuar usándolo.
- Para prevenir la contaminación cruzada y la obtención de resultados falsamente elevados, pipetee las muestras de los pacientes y dispense el conjugado con precisión hacia el fondo de los pozos evitando que se produzcan salpicaduras.
- El sustrato TMB contiene una sustancia irritante que puede ser nociva si es inhalada, ingerida o absorbida por la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, ingestión o contacto con la piel y los ojos.
- La solución de parada consiste en una solución de ácido sulfúrico diluida. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo y puede ser tóxico si es ingerido. Para evitar quemaduras, evite el contacto con la piel y los ojos.
- La adición de la solución de sustrato inicia una reacción cinética que es finalizada por la adición de la solución de parada. Por lo tanto, el sustrato y la solución de parada se deben agregar siguiendo la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Siga las recomendaciones para el control de calidad en el laboratorio clínico mediante la evaluación de los controles del ensayo y/o sueros combinados.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, ictericas o hemolizadas.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de CMIT/MIT como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- Los lectores de placas miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pozo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar desviaciones en el análisis. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta para cada placa.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados de ELISA, se recomienda aumentar el número de lavados.
- La prueba ELISA debe ser realizada por personal calificado que esté familiarizado con buenas prácticas de laboratorio.

13.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) (consulte el cap. 4.1)

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante agua.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

13.2. Consideraciones para El Descarte

Los residuos de productos y preparaciones químicos generalmente son considerados como residuos peligrosos. La eliminación de éste tipo de residuos está regulada por leyes y regulaciones nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o empresas de manejo de residuos para que lo asesoren sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

14. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF

DNOV051

Free T3

(96 Determinations)


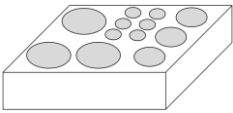


BIBLIOGRAPHY / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFÍA

Pederson, K.O. (1974) Scand. J. Clin. Lab Invest 34, 247.
Wild, D. (1994) Immunoassay Handbook, Stockton Press, 339.
Wenzel, K.W. (1981) Metabolism 30, 717.
Bhagat, C. et al. (1983). Clin Chem, 29, 1324.
Lundberg, P.R. et al. (1982) Clin Chem 28, 1241.
Melmed, S. et al. (1982) J Clin Endocrinol Metab 54, 300.
Lalloz M.R. et al. (1983) Clin Endocrinol 18, 11.







ABBREVIATIONS / ABREVIATIONS / ABREVIACIONES

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one

PACKAGING MATERIALS/ MATERIELS D'EMBALLAGE/ MATERIALES DE EMBALAJE

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
--	--	---	---

SYMBOLS KEY / EXPLICATION DES SYMBOLES / SIMBOLOS

	Manufactured by / Fabriqué par/ Fabricado por r
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Numéro de lot / Número de lote
	Expiration Date / Date de péremption / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Température de conservation / Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark / Marquage CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Référence du catalogue /Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Consulter la notice d'utilisation / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microplate / Microplaque / Microplaca
CONJ	Conjugate / Conjugué / Conjugado
CAL	Calibrator resp. Standard / Callibrateur resp Etalon / Calibrador o bien Estándar
SOLN STOP	Stop solution / Solution d'arrêt / Solução de paragem
SUB TMB	TMB Substrate solution / Substrat TMB / Solución substrato TMB
WASH BUF 50x	Washing solution 50x concentrated / Solution de lavage concentré 50 x / solución de lavado concentrado x50
	Contains sufficient for "n" tests / Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

Free T3

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all specimens and controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Standard 0	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Sample
Standard 0	50 µl	-	-	-	-	-	-
Standard 1	-	50 µl	-	-	-	-	-
Standard 2	-	-	50 µl	-	-	-	-
Standard 3	-	-	-	50 µl	-	-	-
Standard 4	-	-	-	-	50 µl	-	-
Standard 5	-	-	-	-	-	50 µl	-
Sample	-	-	-	-	-	-	50 µl
Conjugate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Swirl the plate gently for 20 – 30 sec Incubate for 1 h room temperature (22...28°C) Wash each well three times with 300 µl diluted Wash Solution (if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times).							
TMB Substrate	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 15 min at room temperature in the dark							
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Mix gently for 15 – 20 sec Photometric measurement at 450 nm, 620-630 nm							



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

Date of issue: 2024-10-11
DNOV051_FT3_IFU_rev02_fromLot_6023BN1