



DCM037-11  
Ed. 01/2015

## FT3 ELISA

per analisi di routine

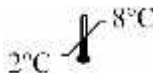
Determinazione immunoenzimatica diretta di triiodotironina libera (FT3) nel siero o plasma umano.

IVD



Vedere etichetta esterna

LOT



Σ = 96 test

REF DKO037

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di triiodotironina libera (FT3) nel siero o plasma umano.

Il kit FT3 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone tiroideo, triiodotironina (T3), è prodotto dalla ghiandola tiroide. Un componente importante nella sintesi è lo iodio. La tirossina è convertita in T3 attivo (tre - quattro volte più potente di T4) all'interno delle cellule dalle deiodinasi (5'-iodinase).

La globulina trasportatrice della Tirossina (TGB) è la proteina carrier principale per l'ormone tiroideo circolante.

Soltanto una frazione molto piccola dell'ormone circolante è libera, 0,3% (non legato); questa frazione è biologicamente attiva. Quindi, la misura della concentrazione libera di triiodotironina è correlata alla condizione clinica, piuttosto che i livelli totali di triiodotironina. Per esempio, l'aumento nei livelli totali di T3 è associato con la gravidanza, gli anticoncezionali orali ed alla terapia estrogenica, risulta in livelli elevati di T3 totale, mentre la concentrazione libera T3 rimane immutata.

Le concentrazioni delle proteine carrier sono alterate in molti casi, quali ad esempio la gravidanza. Quando la funzionalità tiroidea è normale, l'alterazione delle concentrazioni delle proteine carrier, varia la concentrazione totale di T3, mentre la frazione libera rimane costante.

Il legame del T3 svolge un ruolo chiave nel controllo feedback della tiroide, il T3 libero (FT3) agisce sull'ipofisi per inibire la secrezione dell'ormone tiroideo.

Gli ormoni tiroidei agiscono sull'organismo in modo da aumentare il metabolismo basale, interessano la sintesi proteica ed aumentano la sensibilità del corpo alle catecolammine (quali l'adrenalina). Gli ormoni tiroidei sono essenziali per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule del corpo umano. Questi ormoni inoltre regolano il metabolismo delle proteine, dei grassi e dei carboidrati, sono coinvolte nella regolazione dell'uso dei residui energetici da parte delle cellule. Stimoli fisiologici e patologici influenzano la sintesi dell'ormone tiroideo.

Un eccesso di T3 circolante causa la sindrome clinica della tirotossicosi o ipertiroidismo.

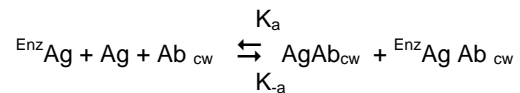
Sia il T3 che il T4 sono usati nella terapia per l'ipotiroidismo.

Alcune condizioni, quali la gravidanza, la terapia estrogenica ed altri fattori non dipendenti dalla tiroide, alterano le concentrazioni di TBG, la misurazione dei livelli di FT3, porterebbero ad una diagnosi errata, poiché i livelli di FT3 risultano inalterati ai cambiamenti della TGB.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il T3 libero (FT3, antigene) presente nel campione, compete con il T3 antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-T3 adsorbito su micropiastra (fase solida) (il coniugato non deve avere legami misurabili con le proteine del siero specialmente TBG e albumina).

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{Ab}_{\text{cw}}$ : anticorpo monospecifico immobilizzato (quantità costante)

Ag: antigene nativo (quantità variabile)

$\text{Enz}^{\text{Ag}}$ : antigene coniugato ad enzima (HRP) (quantità costante)

$\text{Ag Ab}_{\text{cw}}$ : complesso antigene-anticorpo

$\text{Enz}^{\text{Ag}} \text{Ab}_{\text{cw}}$ : complesso antigene-HRP-anticorpo

$\text{K}_a$ : Costante di associazione

$\text{K}_{-a}$ : costante di dissociazione

$\text{K} = \text{k}_a / \text{k}_{-a}$ : costante di equilibrio

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di FT3 presente nel campione.

La concentrazione di FT3 nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)  
CAL0 REF DCE002/3706-0  
CAL1 REF DCE002/3707-0  
CAL2 REF DCE002/3708-0  
CAL3 REF DCE002/3709-0  
CAL4 REF DCE002/3710-0  
CAL5 REF DCE002/3711-0
- Conjugate (1 fialone, 12 mL)  
T3 coniugato con perossidasi di rafano (HRP)  
REF DCE002/3702-0
- Coated Microplate (1 micropiastra breakable)  
Anticorpo anti T3 adsorbito su micropiastra  
REF DCE002/3703-0
- TMB Substrate (1 fialone, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)  
REF DCE004-0
- Stop Solution (1 fialone, 15 mL)  
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)  
REF DCE005-0
- 50X Conc. Wash Solution (1 fialone, 20 mL)  
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

#### Note

*Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce.*

*Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.*

### 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.

- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Diversi farmaci possono avere effetto sul legame tra Triiodotironina e proteine vettrici o sul metabolismo del T3, ciò complica l'interpretazione dei risultati del free-T3.
- Autoanticorpi circolanti verso T3 e inibitori leganti gli ormoni possono dare interferenze. E' riportato in letteratura che l'eparina ha effetti in vivo e in vitro sulla concentrazione dell'FT3. Tuttavia non sono state effettuate prove con campioni contenenti questo anticoagulante.
- In diverse malattie non-tiroidee (NTI), l'accertamento dello stato tiroideo diventa molto difficile. La misura del TSH è raccomandata per identificare disfunzioni tiroidee.
- Disalbuminemie familiari possono indurre a risultati erronei nella determinazione diretta del dosaggio di FT3.
- Non usare per lo screening dei neonati

### 5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe

estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.

- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono tarati su "Human Serum Reference" di free triiodotironina, ed hanno concentrazioni approssimative di:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	0,4	1,2	4,5	8,0	18,0

**I livelli esatti sono riportati nelle etichette per ogni specifico lotto.**

Per le unità SI: 1 pg/mL x 1,536 = pmol/L

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

### 6.3. Preparazione del campione

La determinazione dell'FT3 si effettua su siero o plasma umano.

I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C, per un periodo massimo di 48 ore.

Conservarlo, se non può essere testato entro le 48 ore, a -20°C fino a 30 giorni. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Se testato in duplicato sono necessari 0,10 mL di campione.

### 6.4. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.

- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Campione		50 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
<p>Agitare gentilmente la micropiastra per 20-30 secondi e coprirla.            Incubare 1h a temperatura ambiente (22÷28°C).            Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto; lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita</p> <p><b>Nota importante:</b> ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.</p> <p><b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.</p>			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubare a temperatura ambiente (22÷28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitare delicatamente la micropiastra.            Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.</p>			

## 7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli di ipotiroide, eutiroide e ipertiroide per monitorare la performance del kit. Questi controlli devono essere trattati come sconosciuti e i valori determinati in ogni seduta.

I fogli di controllo qualità dovrebbero essere mantenuti per seguire le performance dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare il trend. Ogni laboratorio dovrebbe scegliere i limiti di accettabilità delle performance del kit. Altri parametri da monitorare includono le intercette 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per la riproducibilità inter-assay. Inoltre, l'assorbanza massima dovrebbe rispecchiare i valori delle sedute precedenti. Deviazioni significative dalle performance stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Usare reagenti freschi per determinare le ragioni delle variazioni.

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (Em) in funzione delle concentrazioni dei calibratori (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>).

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Uno studio di popolazione adulta eutiroide è stato utilizzato per determinare i valori attesi per il kit FT3 ELISA.

	Media (pg/mL)	SD	Range (pg/mL)
Adulti	2,8	0,7	1,4 – 4,2
Gravidanza	3,0	0,6	1,8 – 4,2

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (24x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 4,94%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 13,19%.

### 10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di FT3 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,05 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.3. Specificità

La cross-reattività dell'anti-triiodotironina verso determinate sostanze è stata determinata aggiungendo le soluzioni interferenti a una matrice di siero a varie concentrazioni. La cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra la concentrazione di sostanze interferenti e la concentrazione di Triiodotironina necessaria per spiazzare la stessa quantità di coniugato.

Sostanza	Concentrazione	Cross Reattività
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 pace red cells added to the serum	N/D

### 10.4. Correlazione contro riferimento RIA

Il kit FT3 ELISA Diametra è stato confrontato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 151 campioni di siero. La curva di regressione è:  
(FT3 Diametra) = 0,923\*(FT3 RIA) + 0,350  
 $r^2 = 0,903$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

## BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 01/2015

DCM037-11

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM037-11  
Ed. 01/2015

## FT3 ELISA

for routine analysis

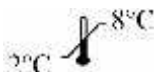
Direct immunoenzymatic determination of free triiodothyronine (FT3) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO037

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of free triiodothyronine (FT3) concentration in human serum and plasma. FT3 ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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.

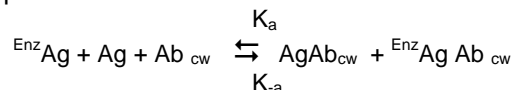
Both T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> are used to treat thyroid hormone deficiency (hypothyroidism).

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. PRINCIPLE

The free T3 (FT3, antigen) in the sample competes with the antigenic T3 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti T3 coated on the microplate (solid phase) (the enzyme conjugate should have no measurable binding to serum proteins especially TBG and albumin).

The interaction is illustrated by the following equation:



Ab<sub>cw</sub>: monospecific immobilised antibody (constant quantity)

Ag: native antigen (variable quantity)

EnzAg: antigen conjugated to enzyme HRP (constant quantity)

Ag Ab<sub>cw</sub>: antigen-antibody complex

EnzAg Ab<sub>cw</sub>: antigen-HRP-antibody complex

K<sub>a</sub>: rate constant of association

K<sub>-a</sub>: rate constant of disassociation

K = k<sub>a</sub>/k<sub>-a</sub>: equilibrium constant

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the FT3 concentration of in the sample.

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

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)  
CAL0 REF DCE002/3706-0  
CAL1 REF DCE002/3707-0  
CAL2 REF DCE002/3708-0  
CAL3 REF DCE002/3709-0  
CAL4 REF DCE002/3710-0  
CAL5 REF DCE002/3711-0
2. Conjugate (1 vial, 12 mL)  
T3 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)  
REF DCE002/3702-0
3. Coated Microplate (1 breakable microplate)  
Antibody anti T3 adsorbed on microplate  
REF DCE002/3703-0
4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)  
REF DCE004-0
5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)  
REF DCE005-0
6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)  
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

#### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

#### Note

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

### 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of reagents for this product has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrator should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- 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.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- Several drugs are known to effect the binding of Triiodothyronine to the thyroid hormone carrier proteins or its metabolism to T3 and complicate the interpretation of FT3 results.
- Circulating autoantibodies to T3 and hormone-binding inhibitors may interfere.  
Heparin has been reported to have in vivo and in vitro effects on FT3 concentration. Therefore, do not obtain samples in which this anti-coagulant has been used.
- In severe no thyroidal 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 FT3 assays.
- Not intended for newborn screening.

### 5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed.. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- 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.
- 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
- 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.

- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against Human Serum Reference for free triiodothyronine and have approximate concentrations of:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	0.4	1.2	4.5	8.0	18.0

**Exact levels are given on the labels on a lot specific basis.**

For SI units: 1 pg/mL x 1.536 = pmol/L

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

### 6.3. Preparation of the Sample

The determination of FT3 should be performed in human serum or plasma.

Specimens may be refrigerated at 2-8°C (for a maximum period of 48 hours). If the specimens cannot be assayed within 48 hours, the samples may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. When assayed in duplicate, 0.10 mL of the specimen is required.

### 6.4. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Sample		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Shake gently the microplate for 20-30 seconds to mix and cover it. Incubate 1 h at room temperature (22±28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted Wash Solution <b>Important note:</b> 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22±28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 7. 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 calibration 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.

## 8. RESULTS

### 8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calculation of Results

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

## 9. REFERENCE VALUES

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine the expected values for FT3 ELISA kit.

	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. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay Variation

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

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

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

### 10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of FT3 that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.05 pg/mL at the 95% confidence limit.

### 10.3. Specificity

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 pace red cells added to the serum	N/D

### 10.4. Correlation with RIA

Diametra FT3 ELISA was compared to another commercially available FT3 assay. 151 serum samples were analysed according in both test systems. The linear regression curve was calculated: (FT3 Diametra) = 0.923\*(FT3 RIA) + 0.350  
 $r^2 = 0.903$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 01/2015

DCM037-11

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15  
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)





DCM037-11  
Ed. 01/2015

## FT3 ELISA

para análisis de rutina

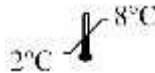
Determinación inmunoenzimática directa de triyodotironina libre (FT3) en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver la etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO037

### USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de FT3 en suero o plasma humano.

El kit FT3 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hormona tiroidea, triyodotironina (T3), es producida por la glándula tiroides. El yodo es un componente importante en la síntesis. La tiroxina se convierte en T3 activa (tres-cuatro veces más potente que la T4) dentro de las células por las deiodinasas (5'-iodinasa). La globulina que transporta la tiroxina (TGB) es la principal proteína transportadora de la hormona tiroidea circulante. Solo una fracción muy pequeña de la hormona circulante está libre, el 0,3% (no unida); esta fracción es biológicamente activa. Por lo tanto, la medición de la concentración libre de triyodotironina está relacionada con la condición clínica, en lugar de los niveles totales de triyodotironina. Por ejemplo, el aumento de los niveles totales de T3 está asociado con el embarazo, los anticonceptivos orales y la terapia con estrógenos, lo que da lugar a niveles elevados de T3 total, mientras que la concentración libre de T3 se mantiene sin cambios. Las concentraciones de las proteínas transportadoras se alteran en muchos casos, como por ejemplo el embarazo. Cuando la función tiroidea es normal, la alteración de las concentraciones de proteínas transportadoras varía la concentración total de T3, mientras que la fracción libre permanece constante. El enlace de T3 juega un papel clave en el control de la retroalimentación de la tiroides; la T3 libre (FT3) actúa en la hipófisis para inhibir la secreción de la hormona tiroidea.

Las hormonas tiroideas actúan en el organismo para aumentar el metabolismo basal, afectan a la síntesis de proteínas y aumentan la sensibilidad del cuerpo a las catecolaminas (como la adrenalina). Las hormonas tiroideas son esenciales para el desarrollo y la diferenciación de las células del cuerpo humano. Estas hormonas también regulan el metabolismo de las proteínas, de las grasas y de los hidratos de carbono, y están involucradas en la regulación del uso de los residuos energéticos por parte de las células. Los estímulos fisiológicos y patológicos influyen en la síntesis de la hormona tiroidea.

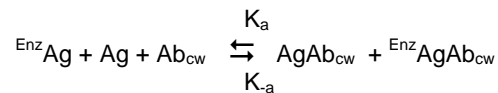
Un exceso de T3 circulante causa el síndrome clínico de tirotoxicosis o hipertiroidismo.

Tanto T3 como T4 se usan en la terapia para hipotiroidismo.

Algunas condiciones, como el embarazo, la terapia con estrógenos y otros factores que no dependen de la tiroides, alteran las concentraciones de TBG. La medición de los niveles de FT3 llevaría a un diagnóstico erróneo, ya que los niveles de FT3 no se ven afectados por los cambios de la TGB.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La triyodotironina libre (FT3, antígeno) presente en la muestra compete con la FT3 antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-T3 absorbido en la microplaca (fase sólida) (el conjugado no debe tener enlaces medibles con las proteínas del suero, especialmente TBG y albúmina). La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{Ab}_{\text{cw}}$ : anticuerpo monoespecífico inmovilizado (cantidad constante)

Ag: antígeno nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAg}$ : antígeno conjugado con enzima HRP (cantidad constante)

$\text{Ag Ab}_{\text{cw}}$ : complejo antígeno-anticuerpo

$\text{EnzAgAb}_{\text{cw}}$ : complejo antígeno-HRP-anticuerpo

$\text{K}_a$ : constante de asociación

$\text{K}_{-a}$ : constante de disociación

$\text{K} = \text{k}_a / \text{k}_{-a}$ : constante de equilibrio

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el Substrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de FT3 presente en la muestra.

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

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

#### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

##### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/3706-0
CAL1	REF	DCE002/3707-0
CAL2	REF	DCE002/3708-0
CAL3	REF	DCE002/3709-0
CAL4	REF	DCE002/3710-0
CAL5	REF	DCE002/3711-0

##### 2. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

T3 conjugada con peroxidasa de rabano (HRP)  
REF DCE002/3702-0

##### 3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti T3 absorbido en la microplaca  
REF DCE002/3703-0

##### 4. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)  
REF DCE004-0

##### 5. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)  
REF DCE005-0

##### 6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

#### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

#### Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 3 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

### 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.

- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Diversos fármacos pueden afectar al enlace entre triyodotironina y proteínas vectoras, o al metabolismo de la T3, lo que complica la interpretación de los resultados de T3 libre.
- Los autoanticuerpos circulantes contra la T3 e inhibidores fijadores de hormonas pueden interferir.  
Se ha indicado en la literatura que la heparina tiene efectos in vivo e in vitro en la concentración de FT3. Por lo tanto, no se han realizado pruebas con muestras que contengan este anticoagulante.
- En diversas enfermedades no tiroideas (NTI), la evaluación del estado tiroideo es muy difícil. Se recomienda la medición de la TSH para identificar disfunciones tiroideas.
- Los casos de disalbuminemia familiar pueden llevar a resultados erróneos en la determinación directa de la dosificación de FT3.
- No usar para la detección en neonatos

### 5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- 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, se recomienda aumentar el número de lavados.

- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al "Human Serum Reference" (referencias de suero humano) de triyodotironina libre, y tienen las siguientes concentraciones aproximadas:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
pg/mL	0	0,4	1,2	4,5	8,0	18,0

**Los niveles exactos se indican en las etiquetas para cada lote específico.**

Para unidades del S.I.:  $1 \text{ pg/mL} \times 1,536 = \text{pmol/L}$

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación de la muestra

La determinación de FT3 se realiza en suero o plasma humano.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C (durante un período máximo de 48 horas).

Si no se va a comprobar en un plazo de 48 horas, puede conservarse a -20°C hasta 30 días. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras. Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,10 mL de la muestra.

## 6.4. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Muestra		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	

Agitar con cuidado la microplaca durante 20-30 segundos y cubrirla.

Incubar 1h a temperatura ambiente (22÷28°C).

Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida

**Nota 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 automático:** si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubar a temperatura ambiente (22÷28°C) durante 15 minutos.

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las

tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para la reproducibilidad interensayo. Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva de calibración ( $C_0-C_5$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia ( $E_m$ ) en función de las concentraciones de los Calibradores ( $C_0-C_5$ ). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolarse del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Se ha utilizado un estudio de población adulta eutiroidea para determinar los valores esperados para el FT3 ELISA kit.

	Media (pg/mL)	SD	Rango (pg/mL)
<b>Adultos</b>	2,8	0,7	1,4 – 4,2
<b>Embarazo</b>	3,0	0,6	1,8 – 4,2

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

## 10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (24x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 4,94%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (12x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 13,19%.

### 10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de FT3 medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,05 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.3. Especificidad

La reactividad cruzada del anti-triyodotironina a determinadas sustancias se determinó mediante la adición de las soluciones interferentes, en concentraciones diferentes, a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó analizando la relación entre la concentración de la sustancia interferente y la concentración de triyodotironina necesaria para desplazar la misma cantidad de conjugado.

Sustancia	Concentración	Reactividad cruzada
I-triyodo-tironina	-	1,0000
I-tiroxina	10 µg/mL	< 0,0002
d-tiroxina	10 µg/mL	< 0,0001
Yodo-tirosina	10 µg/mL	< 0,0001
Diodo-tirosina	10 µg/mL	< 0,0001
Ácido triyodotiroacético	10 µg/mL	< 0,0001
Fenilbutazona	10 µg/mL	< 0,0001
Salicilato de sodio	10 µg/mL	N/D
Fenitoína	10 µg/mL	N/D
Ácido oleico	10 nmol/l	N/D
Albúmina	50 mg/mL	N/D
Hemoglobina	10 µl/mL de glóbulos rojos empaquetados añadidos al suero	N/D

### 10.4. Correlación con referencia RIA

El kit Diametra FT3 ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 151 muestras de suero. La curva de regresión es:  
 $(FT3 \text{ Diametra}) = 0,923 \cdot (FT3 \text{ RIA}) + 0,350$   
 $r^2 = 0,903$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## **BIBLIOGRAFÍA**

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

**Ed. 01/2015**

**DCM037-11**

**DiaMetra S.r.l. Headquater:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

**SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING****ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

**CV% intrasaggio elevato**

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

**CV% intersaggio elevato**

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

**ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS****No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

**Too low reaction (too low ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

**Too high reaction (too high ODs)**

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

**Unexplainable outliers**

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

**ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS****No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

**Reacción escasa (DO demasiado bajas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

**Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)**

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**Valores inexplicablemente fuera de escala**

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

**CV% intraensayo elevado**

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

**CV% interensayo elevado**

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

**ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS****Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

**Réaction trop faible (DO trop basse)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

**Réaction trop intense (DO trop élevée)**

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**Valeurs inexplicablement hors plage**

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

**CV% intra-essai élevé**

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

**CV% inter-essai élevé**

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs