

NovaLisa[®]

Free T4

ELISA

CE

Only for in-vitro diagnostic use

**Instructions for use / Gebrauchsanweisung / Notice d'utilisation / Istruzioni per l'uso /
Instrucciones de uso / Instruções de utilização**

English	2
Deutsch	7
Français	12
Italiano	17
Español	22
Português	27
Abbreviations / Abkürzungen / Abréviations / Abbreviazioni / Abreviaciones / Abreviaturas	34
Packaging materials / Verpackungsmaterialien / Matériels d'emballage / Materiali d'imballaggio / Materiales de embalaje / Materiais de embalagem	34
Symbols Key / Symbolschlüssel / Explication des Symboles / Legenda / Símbolos / Tabela de símbolos	35
Summary of Test Procedure / Kurzanleitung Testdurchführung / Résumé de la procedure de test / Schema della procedura / Resumen de la técnica / Resumo do Procedimento de Teste	36

REF

FT41050 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTENDED USE

The Free T4 ELISA is intended for the quantitative determination of free T4 (Thyroxine) in human serum or plasma (citrate, heparin).

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

The quantitative immunoenzymatic determination of free T4 is based on the competitive ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) technique.

Microtiterplates are coated with specific anti-T4 antibodies. Free T4 in the sample competes with added horseradish peroxidase (HRP) conjugated T4 for antibody binding. Subsequently, the wells are washed to remove all unbound material. The immune complexes are visualized by adding Tetramethylbenzidine (TMB) substrate which gives a blue reaction product. The intensity of this product is inversely proportional to the amount of free T4 in the sample. Sulphuric acid is added to stop the reaction. This produces a yellow endpoint colour. Absorbance at 450/620 nm is read using an ELISA Microtiterplate reader.

3. MATERIALS

3.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 break-apart 8-well snap-off strips coated with anti-T4 antibodies; in resealable aluminium foil.
- **SOLN STOP:** 1 bottle containing 15 mL sulphuric acid, 0.2 mol/L; ready to use; red cap.
- **WASH BUF 20x:** 1 bottle containing 50 mL of a 20-fold concentrated phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2 ± 0.2, for washing the wells; white cap; 0.2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugate:** 1 bottle containing 15 mL of peroxidase labelled T4; coloured red; ready to use; black cap; ≤ 0.02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 bottle containing 15 mL 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), < 0.1 %; ready to use; yellow cap.
- **Control:** 1 vial containing 1 mL; brownish colour; ready to use; white cap; ≤ 0.01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Standards:** 6 vials, each containing 1 mL standard; brownish colour; ready to use; yellow cap; ≤ 0.01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Standard A:	0 ng/L
Standard B:	4 ng/L
Standard C:	10 ng/L
Standard D:	20 ng/L
Standard E:	35 ng/L
Standard F:	75 ng/L

For hazard and precautionary statements see 11.1.

3.2. Materials supplied

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

3.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes of 50 and 100 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

4. STABILITY AND STORAGE

Store the kit at 2...8 °C. The opened reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C. The standards can be kept for a maximum of 6 months after opening.

5. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents and samples to room temperature (20...25 °C) and mix them before starting the test run!

5.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with anti-T4 antibodies. Immediately after removal of the strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C.

5.2. **WASH BUF 20x**

Dilute **WASH BUF 20x** 1 + 19; e. g. 10 mL **WASH BUF 20x** + 190 mL distilled water. The diluted buffer (**WASH BUF 1x**) is stable for 5 days at room temperature (20...25 °C). In case crystals appear in the concentrate, warm up the solution to 37 °C e.g., in a water bath. Mix well before dilution.

5.3. Standards

The standards are ready to use. They are stable until the expiry date stated on the label. Once opened, they can be kept for 6 months if stored at 2...8 °C; but no longer than the expiry date stated on the label.

5.4. **SUB TMB**

The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C, away from the light. **SUB TMB** should be colourless or could have a slight blue tinge. If **SUB TMB** turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

Use human serum or plasma (citrate, heparin) samples with this assay. If the assay is performed within 5 days after sample collection, the samples should be kept at 2...8 °C; otherwise, they should be aliquoted and stored deep-frozen (-70...-20 °C). If samples are stored frozen, mix thawed samples well before testing. Avoid repeated freezing and thawing. Heat inactivation of samples is not recommended.

7. ASSAY PROCEDURE

Please read the instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the instructions for use as described. The following test procedure is only validated for manual procedure. If performing the test on ELISA automatic systems we recommend increasing the volume of **WASH BUF 1x** from 300 µL to 350 µL to avoid washing effects. Pay attention to chapter 11. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all samples and standards/controls (duplicates recommended) should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

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

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

Adjust the incubator to 37 ± 1 °C.

1. Dispense 50 µL standards/controls and samples into their respective wells.
2. Dispense 100 µL conjugate into all wells.
3. Cover wells with the foil supplied in the kit.
4. **Incubate for 1 hour ± 5 min at 37 ± 1 °C.** Do not expose to direct sunlight.
5. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well five times with 300 µL of **WASH BUF 1x**. Avoid overflows from the reaction wells. The interval between washing and aspiration should be > 5 sec. At the end carefully remove remaining fluid by tapping strips on tissue paper prior to the next step!

Note: Washing is important! Insufficient washing results in poor precision and false results.

6. Dispense 100 µL **SUB TMB** into all wells.
7. **Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark.** A blue colour occurs due to an enzymatic reaction.
8. Dispense 100 µL **SOLN STOP** into all wells in the same order and at the same rate as for the **SUB TMB**, thereby a colour change from blue to yellow occurs.
9. Measure the absorbance at 450/620 nm within 30 min after addition of the **SOLN STOP**.

7.1. Measurement

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

Bichromatic measurement using a reference wavelength of 620 nm is recommended.

Where applicable calculate the mean absorbance values of all duplicates.

8. RESULTS

8.1. Run Validation Criteria

In order for an assay run to be considered valid, these Instructions for Use have to be strictly followed and the following criteria must be met:

- **Standard A:** Absorbance value > **1.000** and > **Standard B**
- **Standard B:** Absorbance value > **Standard C**
- **Standard C:** Absorbance value > **Standard D**
- **Standard D:** Absorbance value > **Standard E**
- **Standard E:** Absorbance value > **Standard F**
- **Standard F:** Absorbance value < **0.200**
- **Control:** Result in ng/L within the range indicated on the label.

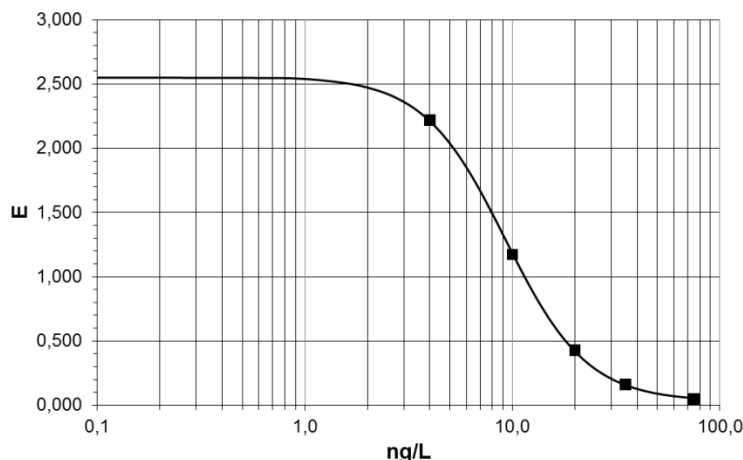
Standard A > Standard B > Standard C > Standard D > Standard E > Standard F

If these criteria are not met, the test is not valid and must be repeated.

8.2. Calculation of Results

In order to obtain **quantitative results in ng/L** plot the (mean) absorbance values of the Standards A - F (linear y-axis) against their corresponding concentrations (logarithmic x-axis) and draw the best-fit curve (e.g., Four Parameter Logistic) through the plotted points. Read results from this standard curve employing the (mean) absorbance values of each sample and control.

8.3. Typical Standard Curve



8.4. Interpretation of Results

Normal value ranges for this ELISA should be established by each laboratory based on its own patient populations in the geographical areas serviced.

Test results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also, every decision for therapy should be taken individually.

Diagnosis of a disease should not be established on the basis of a single test result. A precise diagnosis should take into consideration clinical history, symptomatology as well as laboratory findings.

8.4.1. Normal Range

A total of 173 samples from apparently healthy adults aged 18 - 68 years were assayed to establish the reference range interval for the Free T4 ELISA according to approved guideline CLSI EP28-A3c. The reference interval for the Free T4 ELISA was found to be **7 – 22 ng/L** based on the central 95 % of the frequency distribution. The mean value, standard deviation and expected range are:

	Mean (ng/L)	SD	Range (ng/L)
Adults (n=173)	11.10	5.27	7-22

8.4.2. Samples from pregnant women

Samples from apparently healthy pregnant women were used to determine expected free T4 values for the Free T4 ELISA during pregnancy. The mean value, standard deviation and expected range are:

	Mean (ng/L)	SD	Range (ng/L)
Pregnancy (n=30)	10.03	2.19	6-16

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1. Precision

<u>Intraassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (E)</u>	<u>CV (%)</u>
# 1	24	2.086	2.69
# 2	24	1.337	5.47
# 3	24	0.224	6.28
<u>Interassay</u>	<u>n</u>	<u>Mean (ng/L)</u>	<u>CV (%)</u>
# 1	12	11.18	6.68
# 2	12	24.29	4.55
# 3	12	36.96	3.99

9.2. Analytical Sensitivity

The Limit of Detection (LoD) for the Free T4 ELISA is 1.06 ng/L, determined consistent with the guidelines in CLSI document EP17-A2 based on the proportions of false positives (α) less than 5 % and false negatives (β) less than 5 %; using 240 determinations, with 120 analyte-free samples and 120 low level samples; and a Limit of Blank (LoB) of 0.00 ng/L.

9.3. Analytical Specificity

9.3.1. Cross-Reactivity

The following substances, when tested in samples at free T4 concentrations of approx. 10 ng/L and 25 ng/L according to CLSI protocol EP07-A2, caused no cross-reactivity up to the concentrations indicated in the table below:

Substance Tested	Test Concentration [ng/L]	Cross-reactivity [%]
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3)	10 000	< 0.060
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (Reverse T3)	100 000	< 0.001
3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T2)	50 000	< 0.001
3,3',5-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0.010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0.001

9.3.2. Interferences

The following substances, when tested in samples at free T4 concentrations of approx. 10 ng/L and 25 ng/L according to CLSI protocol EP07-A2, were found not to interfere at the concentrations indicated. A bias less than 10 %* is not considered a significant interference.

Substance Tested	Test Concentration
Bilirubin	200 µg/mL
Hemoglobin	2 mg/mL
Triglycerides	35 mg/mL
Albumin	63 mg/mL

* upper limit of 95 % confidence interval

Investigation of a rheumatoid factor positive specimen panel did not reveal significant evidence of falsely elevated or decreased free T4 levels due to interference. However, in free-hormone immunoassays interference caused by rheumatoid factors should be considered.

9.4. Correlation

The Free T4 ELISA was compared with another immunoassay. 130 specimens were used (the values ranged from approx. 1 ng/L to approx. 40 ng/L). The linear regression curve was calculated.

$$y = 0.973 + 0.145x$$

$$R^2 = 0.917$$

9.5. Measurement Range

The measurement range is 1.06 ng/L – 75 ng/L.

10. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Bacterial contamination or repeated freeze-thaw cycles of the sample may affect the absorbance values.

11. 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.
- All materials of human or animal origin should be regarded and handled as potentially infectious.
- 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.
- Do not interchange reagents or Microtiterplates 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 standard/control vials for microbial contamination prior to further use.
- To avoid cross-contamination and falsely elevated results pipette patient samples and dispense reagents without splashing accurately into the wells.
- The ELISA is only designed for qualified personnel following the standards of good laboratory practice (GLP).
- For further internal quality control each laboratory should additionally use known samples.

11.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) or MIT (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



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

Reagents may contain 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (refer to 3.1).
Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

Warning



H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation
P280	Wear protective gloves/ protective clothing.
P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water.
P305+P351+P338	IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
P337+P313	If eye irritation persists: Get medical advice/attention.

Further information can be found in the safety data sheet.

11.2. 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.

12. ORDERING INFORMATION

REF

FT41050

Free T4

(96 Determinations)

DEUTSCH

1. VERWENDUNGSZWECK

Der Free T4 ELISA ist für den quantitativen Nachweis von freiem T4 (Thyroxin) in humanem Serum oder Plasma (Citrat, Heparin) bestimmt.

2. TESTPRINZIP

Die quantitative immunoenzymatische Bestimmung von freiem T4 beruht auf der kompetitiven ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) Technik.

Mikrotiterplatten sind mit spezifischen anti-T4 Antikörpern beschichtet. Freies T4 aus der Probe konkurriert mit zugegebenem Meerrettich-Peroxidase-(HRP) konjugiertem T4 um die Antikörperbindung. Anschließend wird alles ungebundene Material durch Waschen entfernt. Die Immunkomplexe werden durch Blaufärbung nach Inkubation mit Tetramethylbenzidin (TMB)-Substratlösung nachgewiesen. Die Intensität dieses Reaktionsproduktes ist umgekehrt proportional zur Menge an freiem T4 in der Probe. Die Reaktion wird mit Schwefelsäure gestoppt, wodurch ein Farbumschlag von blau nach gelb erfolgt. Die Absorption wird bei 450/620 nm mit einem Mikrotiterplatten-Photometer gemessen.

3. MATERIALIEN

3.1. Mitgelieferte Reagenzien

- **Mikrotiterplatte:** 12 teilbare 8er-Streifen, beschichtet mit Antikörpern gegen T4; in wieder verschließbarem Aluminiumbeutel.
- **SOLN|STOP:** 1 Flasche mit 15 mL Schwefelsäure, 0,2 mol/L; gebrauchsfertig; rote Verschlusskappe.
- **WASH|BUF|20x:** 1 Flasche mit 50 mL eines 20-fach konzentrierten Phosphatpuffers (0,2 M), zum Waschen der Kavitäten; pH 7,2 ± 0,2; weiße Verschlusskappe; 0,2% (w/v) 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan.
- **Konjugat:** 1 Flasche mit 15 mL Peroxidase-konjugiertem T4, rot gefärbt; gebrauchsfertig; schwarze Verschlusskappe; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **SUB|TMB:** 1 Flasche mit 15 mL 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), < 0,1 % gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe.
- **Kontrolle:** 1 Fläschchen mit 1 mL; bräunlich gefärbt; gebrauchsfertig; weiße Verschlusskappe; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Standards:** 6 Fläschchen mit je 1 mL Standardlösung; bräunlich gefärbt; gebrauchsfertig; gelbe Verschlusskappe; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
 - Standard A: 0 ng/L
 - Standard B: 4 ng/L
 - Standard C: 10 ng/L
 - Standard D: 20 ng/L
 - Standard E: 35 ng/L
 - Standard F: 75 ng/L

Für Gefahren- und Sicherheitshinweise siehe 11.1.

3.2. Mitgeliefertes Zubehör

- 1 selbstklebende Abdeckfolie
- 1 Gebrauchsanweisung

3.3. Erforderliche Materialien und Geräte

- Mikrotiterplatten-Photometer mit Filtern 450/620 nm
- Inkubator 37 °C
- Manuelle oder automatische Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten
- Mikropipetten (50, 100 µL)
- Vortex-Mischer
- Destilliertes Wasser
- Plastikröhrchen für den einmaligen Gebrauch

4. STABILITÄT UND LAGERUNG

Testkit bei 2...8 °C lagern. Die geöffneten Reagenzien sind bis zu den auf den Etiketten angegebenen Verfallsdaten verwendbar, wenn sie bei 2...8 °C gelagert werden. Die Standards sind nach dem Öffnen noch maximal 6 Monate haltbar.

5. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Es ist sehr wichtig, alle Reagenzien und Proben vor ihrer Verwendung auf Raumtemperatur (20...25 °C) zu bringen und zu mischen!

5.1. Mikrotiterplatte

Die abbrechbaren Streifen sind mit Antikörpern gegen T4 beschichtet. Nicht verbrauchte Vertiefungen im Aluminiumbeutel zusammen mit dem Trockenmittel sofort wieder verschließen und bei 2...8 °C lagern.

5.2. **WASH|BUF|20x**

WASH|BUF|20x ist im Verhältnis 1 + 19 zu verdünnen; z.B. 10 mL **WASH|BUF|20x** + 190 mL destilliertes Wasser. Der verdünnte Puffer (**WASH|BUF|1x**) ist bei Raumtemperatur (20...25 °C) 5 Tage haltbar. Sollten Kristalle im Konzentrat auftreten, die Lösung z.B. in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmen und vor dem Verdünnen gut mischen.

5.3. **Standards**

Die Standards sind gebrauchsfertig. Nach dem ersten Öffnen sind sie noch 6 Monate haltbar, wenn sie bei 2...8°C gelagert werden; aber nicht länger als bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum.

5.4. **SUB|TMB**

Die gebrauchsfertige Lösung ist bei 2...8 °C vor Licht geschützt aufzubewahren. **SUB|TMB** ist farblos, kann aber auch leicht hellblau sein. Sollte **SUB|TMB** blau sein, ist es kontaminiert und kann nicht im Test verwendet werden.

6. **ENTNAHME UND VORBEREITUNG DER PROBEN**

Es sollten humane Serum- oder Plasmaproben (Citrat, Heparin) verwendet werden. Werden die Bestimmungen innerhalb von 5 Tagen nach Blutentnahme durchgeführt, können die Proben bei 2...8 °C aufbewahrt werden, sonst aliquotieren und tiefgefrieren (-70...-20 °C). Wieder aufgetaute Proben vor der Testdurchführung gut schütteln. Wiederholtes Tiefgefrieren und Auftauen vermeiden!

Hitzeinaktivierung der Proben wird nicht empfohlen.

7. **TESTDURCHFÜHRUNG**

Gebrauchsanweisung **vor** Durchführung des Tests sorgfältig lesen. Für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse ist es notwendig, die Gebrauchsanweisung genau zu befolgen. Die folgende Testdurchführung ist für die manuelle Methode validiert. Beim Arbeiten mit ELISA Automaten empfehlen wir, um Wascheffekte auszuschließen, das Volumen des **WASH|BUF|1x** von 300 µL auf 350 µL zu erhöhen. Kapitel 11 beachten. Vor Testbeginn die Verteilung bzw. Position der Proben und der Standards/Kontrollen (Doppelbestimmung empfohlen) genau festlegen. Die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen (Kavitäten) in den Streifenhalter einsetzen.

Den Test in der angegebenen Reihenfolge und ohne Verzögerung durchführen.

Für jeden Pipettierschritt der Standards/Kontrollen und Proben saubere Einmalspitzen verwenden.

Den Inkubator auf 37 ± 1 °C einstellen.

1. Je 50 µL Standards/Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
2. 100 µL Konjugat in alle Vertiefungen pipettieren.
3. Die Streifen mit der mitgelieferten Abdeckfolie bedecken.
4. **1 h ± 5 min bei 37 ± 1 °C inkubieren.** Nicht dem direkten Sonnenlicht aussetzen.
5. Am Ende der Inkubationszeit Abdeckfolie entfernen und die Inkubationsflüssigkeit aus den Teststreifen absaugen. Anschließend fünfmal mit 300 µL **WASH|BUF|1x** waschen. Überfließen von Flüssigkeit aus den Vertiefungen vermeiden. Das Intervall zwischen Waschen und Absaugen sollte > 5 sec betragen. Nach dem Waschen die Teststreifen auf Fließpapier ausklopfen, um die restliche Flüssigkeit zu entfernen.
Beachte: Der Waschvorgang ist wichtig, da unzureichendes Waschen zu schlechter Präzision und falschen Messergebnissen führt!
6. 100 µL **SUB|TMB** in alle Vertiefungen pipettieren.
7. **Genau 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (20...25 °C) inkubieren.** Bei enzymatischer Reaktion findet eine Blaufärbung statt.
8. In alle Vertiefungen 100 µL **SOLN|STOP** in der gleichen Reihenfolge und mit den gleichen Zeitintervallen wie bei Zugabe der **SUB|TMB** pipettieren, dadurch erfolgt ein Farbwechsel von blau nach gelb.
9. Die Extinktion der Lösung in jeder Vertiefung bei 450/620 nm innerhalb von 30 min nach Zugabe der **SOLN|STOP** messen.

7.1. **Messung**

Extinktion aller Kavitäten bei 450 nm messen und die Messwerte der Standards/Kontrollen und Proben notieren.

Eine **bichromatische** Messung mit der Referenzwellenlänge 620 nm wird empfohlen.

Falls Doppel- oder Mehrfachbestimmungen durchgeführt wurden, den **Mittelwert der Extinktionswerte** berechnen.

8. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

8.1. Testgültigkeitskriterien

Damit ein Testlauf als valide betrachtet werden kann, muss diese Gebrauchsanweisung strikt befolgt werden, und die folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- **Standard A:** Extinktionswert > 1,000 und > Standard B
- **Standard B:** Extinktionswert > Standard C
- **Standard C:** Extinktionswert > Standard D
- **Standard D:** Extinktionswert > Standard E
- **Standard E:** Extinktionswert > Standard F
- **Standard F:** Extinktionswert < 0,200
- **Kontrolle:** Ergebnis in ng/L innerhalb des auf dem Etikett angegebenen Bereichs

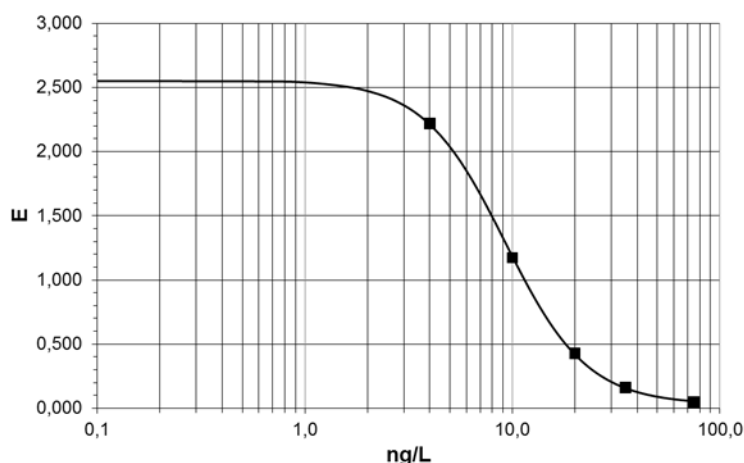
Standard A > Standard B > Standard C > Standard D > Standard E > Standard F

Sind diese Kriterien nicht erfüllt, ist der Testlauf ungültig und muss wiederholt werden.

8.2. Messwertberechnung

Um **quantitative Ergebnisse in ng/L** zu erhalten, werden die Extinktionen (Mittelwerte) der Standards A - F (y-Achse, linear) gegen ihre entsprechenden Konzentrationen (x-Achse, logarithmisch) aufgetragen. Durch diese Punkte wird eine Ausgleichskurve (z.B. 4-Parameter-Logistik) gezeichnet. Anhand dieser Standardkurve lassen sich die Ergebnisse der (gemittelten) Extinktionswerte der jeweiligen Proben und der Kontrolle ablesen.

8.3. Typische Standardkurve



8.4. Interpretation der Ergebnisse

Normwert-Bereiche für diesen ELISA sollten, basierend auf dem entsprechenden Patientenkollektiv im jeweiligen Einzugsgebiet, individuell von jedem Labor erstellt werden.

Testergebnisse sollten mit dem kompletten Krankheitsbild des Patienten abgeglichen werden. Ebenso sollte jede Therapieentscheidung individuell getroffen werden.

Die Diagnose einer Krankheit darf nicht allein auf der Basis des Ergebnisses einer Bestimmung gestellt werden. Die anamnestischen Daten sowie die Symptomatologie des Patienten müssen zusätzlich zu den Laborbefunden in Betracht gezogen werden.

8.4.1. Normalbereich

Insgesamt 173 Proben von scheinbar gesunden Erwachsenen im Alter von 18 bis 68 Jahren wurden untersucht, um den Referenzbereich des Free T4 ELISA gemäß der anerkannten Richtlinie CLSI EP28-A3c zu bestimmen. Das Referenzintervall für den Free T4 ELISA betrug **7 - 22 ng/L**, bezogen auf die zentralen 95 % der Häufigkeitsverteilung. Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Normalbereich sind:

	Mittelwert (ng/L)	SD	Bereich (ng/L)
Erwachsene (n=173)	11,10	5,27	7-22

8.4.2. Proben von Schwangeren

Es wurde eine Studie mit Proben von scheinbar gesunden Schwangeren durchgeführt, um die zu erwartenden freien T4 Werte während der Schwangerschaft für den Free T4 ELISA zu ermitteln. Der Mittelwert, die Standardabweichung und der Normalbereich sind:

	Mittelwert (ng/L)	SD	Bereich (ng/L)
Schwangere (n=30)	10,03	2,19	6 - 16

9. TESTMERKMALE

Die Ergebnisse beziehen sich auf die untersuchten Probenkollektive; es handelt sich nicht um garantierte Spezifikationen.

9.1. Präzision

Intraassay	n	Mittelwert (E)	Vk (%)
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28

Interassay	n	Mittelwert (ng/L)	Vk (%)
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

9.2. Analytische Sensitivität

Die Nachweisgrenze (LoD) für den Free T4 ELISA beträgt 1,06 ng/L. Sie wurde gemäß den Richtlinien des CLSI-Dokuments EP17-A2, basierend auf einem Anteil von falsch positiven (α) von weniger als 5 % und von falschen negativen (β) von weniger als 5 %, unter Verwendung von 240 Bestimmungen mit 120 analytfreien Proben, 120 niedrig konzentrierten Proben und einer Leerwertgrenze (LoB) von 0,00 ng/L bestimmt.

9.3. Analytische Spezifität

9.3.1. Kreuzreaktivität

Wenn die folgenden Substanzen zu Proben mit freien T4-Konzentrationen von ca. 10 ng/L und 25 ng/L gemäß CLSI-Protokoll EP07-A2 zugegeben wurden, verursachten sie bis zu den in der nachstehenden Tabelle angegebenen Konzentrationen keine Kreuzreaktivitäten:

Getestete Substanz	Testkonzentration [ng/L]	Kreuzreaktivität [%]
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (Reverses T3)	100 000	< 0,001
3,5-Dijodo-L-thyronin (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5'-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

9.3.2. Interferenzen

Die folgenden Substanzen zeigten bei den angegebenen Konzentrationen keine Interferenz, wenn sie in Proben mit freien T4-Konzentrationen von ca. 10 ng/L und 25 ng/L gemäß CLSI-Protokoll EP07-A2 getestet wurden. Ein Bias von weniger als 10 %* wird nicht als signifikante Interferenz angesehen.

Getestete Substanz	Testkonzentration
Bilirubin	200 µg/mL
Hämoglobin	2 mg/mL
Triglyceride	35 mg/mL
Albumin	63 mg/mL

* obere Grenze des 95 % Konfidenzintervalls

Die Untersuchung eines Rheumafaktor-positiven Probenkollektives ergab keine signifikanten Hinweise auf falsch erhöhte oder verringerte freie T4-Spiegel aufgrund von Interferenzen. Bei Immunoassays zum Nachweis von freien Hormonen sollte jedoch eine Interferenz durch Rheumafaktoren in Betracht gezogen werden.

9.4. Übereinstimmung

Der Free T4 ELISA wurde mit einem anderen Immunoassay verglichen. Dabei wurden 130 Proben mit Werten von 1,10 ng/L bis 39,91 ng/L gemessen. Die lineare Regression wurde berechnet.

$$y = 0,973 x + 0,145$$

$$R^2 = 0,917$$

9.5. Messbereich

Der Messbereich ist 1,06 ng/L – 75 ng/L.

10. GRENZEN DES VERFAHRENS

Kontamination der Proben durch Bakterien oder wiederholtes Einfrieren und Auftauen können zu einer Veränderung der Messwerte führen.

11. SICHERHEITSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Die Testdurchführung, die Information, die Sicherheitsmaßnahmen und Warnhinweise in der Gebrauchsanweisung sind strikt zu befolgen. Bei Anwendung des Testkits auf Diagnostika-Geräten ist die Testmethode zu validieren. Jede Änderung am Aussehen, der Zusammensetzung und der Testdurchführung sowie jede Verwendung in Kombination mit anderen Produkten, die der Hersteller nicht autorisiert hat, ist nicht zulässig; der Anwender ist für solche Änderungen selbst verantwortlich. Der Hersteller haftet für falsche Ergebnisse und Vorkommnisse aus solchen Gründen nicht. Auch für falsche Ergebnisse aufgrund von visueller Auswertung wird keine Haftung übernommen.
- Nur für in-vitro-Diagnostik.
- Alle Materialien menschlichen oder tierischen Ursprungs sind als potentiell infektiös anzusehen und entsprechend zu behandeln.
- Alle verwendeten Bestandteile menschlichen Ursprungs sind auf Anti-HIV-AK, Anti-HCV-AK und HBsAg nicht-reaktiv getestet.
- Reagenzien und Mikrotiterplatten unterschiedlicher Chargen nicht untereinander austauschen.
- Keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Testkits verwenden.
- Nicht nach Ablauf des Verfallsdatums verwenden.
- Nur saubere Pipettenspitzen, Dispenser und Labormaterialien verwenden.
- Verschlusskappen der einzelnen Reagenzien nicht untereinander vertauschen, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.
- Flaschen sofort nach Gebrauch fest verschließen, um Verdunstung und mikrobielle Kontamination zu vermeiden.
- Nach dem ersten Öffnen Konjugat und Standards/Kontrollen vor weiterem Gebrauch auf mikrobielle Kontamination prüfen.
- Zur Vermeidung von Kreuzkontamination und falsch erhöhten Resultaten, Reagenzien sorgfältig in die Kavitäten pipettieren.
- Der ELISA ist nur für qualifiziertes Personal bestimmt, das den Standards der Guten Laborpraxis (GLP) folgt.
- Zur weiteren internen Qualitätskontrolle sollte jedes Labor zusätzlich bekannte Proben verwenden.

11.1. Sicherheitshinweis für Reagenzien, die Gefahrstoffe enthalten

Die Reagenzien können CMIT/MIT (3:1) oder MIT enthalten (siehe 3.1).
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen.
P261	Einatmen von Aerosol vermeiden.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P333+P313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P362+P364	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

Die Reagenzien können 5-Brom-5-nitro-1,3-dioxan enthalten (siehe 3.1)
Daher gelten die folgenden Gefahren- und Sicherheitshinweise.

Achtung



H315	Verursacht Hautreizungen.
H319	Verursacht schwere Augenreizung.
P280	Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen.
P302+P352	BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Seife und Wasser waschen.
P305+P351+P338	BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen. Eventuell Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.
P337+P313	Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

Weitere Informationen können dem Sicherheitsdatenblatt entnommen werden

11.2. Entsorgungshinweise

Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen werden im Allgemeinen als gefährliche Abfälle betrachtet. Die Entsorgung dieser Art von Abfällen wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt. Wenden Sie sich an Ihre örtlichen Behörden oder an Abfallentsorgungsunternehmen, die Sie über die Entsorgung von Sondermüll beraten.

Informationen zu den Verpackungsmaterialien finden Sie unter VERPACKUNGSMATERIALIEN.

12. BESTELLINFORMATIONEN

REF

FT41050

Free T4

(96 Bestimmungen)

FRANÇAIS

1. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Free T4 ELISA est prévue pour la détection quantitative de la T4 libre (Thyroxine) dans le sérum et le plasma (citrate, héparine) humains.

2. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique quantitative de la T4 libre est basée sur la technique ELISA compétition (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les Plaques de Microtitrage sont recouvertes d'anticorps spécifiques anti-T4. La T4 libre dans l'échantillon entre en compétition avec la T4 conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) pour la liaison de l'anticorps. Par la suite, les puits sont lavés pour éliminer tout matériau non lié. Les complexes immunologiques sont visualisés en ajoutant du substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est inversement proportionnelle à la quantité de T4 libre dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA.

3. MATERIEL

3.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage** : 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'anticorps anti-T4; en sachets d'aluminium refermables.
- **SOLN STOP** : 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **WASH BUF 20x** : 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc ; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Conjugué** : 1 flacon contenant 15 mL T4 conjuguées à la peroxydase; prêt à l'emploi; couleur rouge, bouchon noir; ≤ 0,02% (v/v) MIT
- **SUB TMB** : 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) , < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune.
- **Contrôle** : 1 flacon contenant 1 mL; de couleur marron clair; prêt à l'emploi, bouchon blanc; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Étalons** : 6 flacons contenant chacun 1 mL étalon; de couleur marron clair; prêt à l'emploi, bouchon jaune; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).

Étalon A:	0 ng/L
Étalon B:	4 ng/L
Étalon C:	10 ng/L
Étalon D:	20 ng/L
Étalon E:	35 ng/L
Étalon F:	75 ng/L

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 11.1.

3.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 notice d'utilisation

3.3. Matériel et équipement requis

- Photomètre de Plaque de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaques de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 50 et 100 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

4. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C. Les étalons peuvent être conservés jusqu'à 6 mois après leur ouverture.

5. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

5.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'anticorps anti-T4. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrettes restantes doivent être scellées le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluer **WASH | BUF | 20x** 1+19; par exemple 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL d'eau distillée. Le Tampon diluée (**WASH | BUF | 1x**) est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

5.3. **Étalons**

Les étalons sont prêts à être utilisés. Ils sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Ils sont encore stables pendant 6 mois lorsqu'ils sont conservés à 2...8 °C; mais pas plus longtemps que la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

5.4. **SUB | TMB**

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. **SUB | TMB** doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si **SUB | TMB** devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

6. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

7. PROCEDE DE TEST

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un système automatique pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le volume du **WASH | BUF | 1x** de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 11. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé déterminer en double) doivent être soigneusement établi. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37 ± 1°C.

1. Pipeter 50 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits.
3. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure ± 5 minutes à 37 ± 1°C.** Non esporre a fonti di luce diretta.
5. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits cinq fois avec 300 µL du **WASH | BUF | 1x**. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.
Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats !
6. Pipeter 100 µL de la **SUB | TMB** dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante (20...25 °C) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
8. Pipeter 100 µL de la **SOLN | STOP** dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la **SUB | TMB**, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
9. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la **SOLN | STOP**.

7.1. **Mesure**

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'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

8. RESULTATS

8.1. Critères de validation

Pour qu'une série d'analyses soit considérée comme valide, ce notice d'utilisation doivent être strictement suivies, et les critères suivants doivent être respectés:

- **Étalon A:** Valeur d'absorbance > 1,000 et > Standard B
- **Étalon B** Valeur d'absorbance > Étalon C
- **Étalon C** Valeur d'absorbance > Étalon D
- **Étalon D:** Valeur d'absorbance > Étalon E
- **Étalon E:** Valeur d'absorbance > Étalon F
- **Étalon F::** Valeur d'absorbance < 0,200
- **Contrôle:** Résultats en ng/L dans l'intervalle indiquée sur l'étiquette

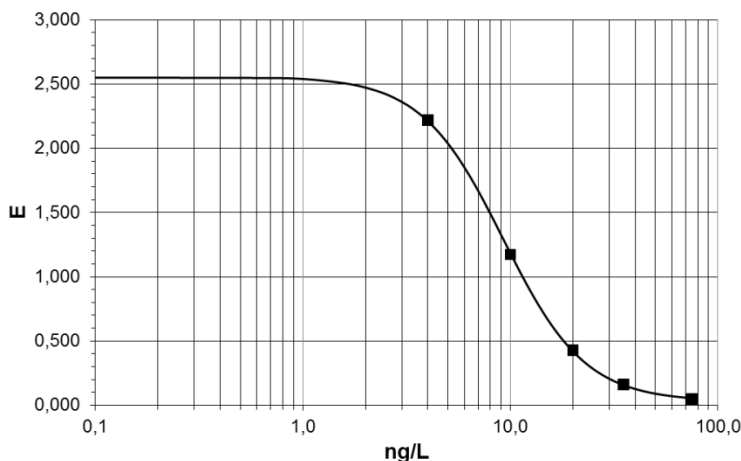
Étalon A > Étalon B > Étalon C > Étalon D > Étalon E > Étalon F

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

8.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des **résultats quantitatifs en ng/L**, tracer les valeurs d'absorbance (moyennes) des étalons A-F (axe linéaire y) par rapport à leurs concentrations correspondantes (axe des x logarithmique) et tracer la courbe de meilleur ajustement (par exemple Logistique à quatre paramètres) à travers les points tracés. Lisez les résultats de cette courbe standard en utilisant les valeurs d'absorbance (moyennes) de chaque échantillon et contrôle.

8.3. Courbe d'étalonnage Standard



8.4. Interprétation des résultats

Les intervalles de mesures normales pour ce test ELISA doivent être établies par chaque laboratoire sur la base de ses propres populations de patients dans les zones géographiques desservies.

Les résultats du test doivent être vérifiés pour tout l'état clinique du patient. De plus, chaque décision thérapeutique doit être prise individuellement.

Le diagnostic d'une maladie ne doit pas être établi sur la base d'un seul résultat de test. Un diagnostic précis doit prendre en compte de l'historique clinique, de la symptomatologie et des résultats de laboratoire.

9.4.1. Normale Mesure

Un total de 173 échantillons d'adultes apparemment en bonne santé et âgés de 18 à 68 ans ont été analysés afin d'établir l'intervalle de référence pour le Free T4 ELISA conformément à la directive approuvée CLSI protocole EP28-A3c. La plage de référence du test Free T4 ELISA a été trouvée entre **7- 22 ng/L** sur la base de la distribution centrale de 95 % de la fréquence. La valeur moyenne, l'écart type et la plage attendue sont les suivants:

	Valeur moyenne (ng/L)	SD	Intervalle (ng/L)
Adultes (n=173)	11,10	5,27	7-22

9.4.2. Échantillons de femmes enceintes

Des échantillons de femmes enceintes apparemment en bonne santé ont été utilisés pour déterminer les valeurs de T4 libre attendues pour le test Free T4 ELISA pendant la grossesse. La valeur moyenne, l'écart type et la plage attendue sont les suivants:

	Valeur moyenne (ng/L)	SD	Intervalle (ng/L)
Femmes Enceintes (n=30)	10,03	2,19	6-16

9. PERFORMANCES DU TEST

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

9.1. Précision

Intra-essai	n	moyenne (E)	CV (%)
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28
Inter-essai	n	moyenne (ng/L)	CV (%)
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

9.2. Sensibilité Analytique

La limite de détection (LoD) du test Free T4 ELISA est de 1,06 ng/L, déterminée conformément aux recommandations du CLSI protocole EP17- A2, sur la base de proportions de faux positifs (α) inférieurs à 5% et de faux négatifs (β) inférieurs à 5 %; en utilisant 240 déterminations, avec 120 échantillons non analysés et 120 échantillons à faible niveau concentration; et une limite du blanc (LoB) de 0,00 ng/L.

9.3. Spécificité Analytique

9.3.1. Réaction croisée

Les substances suivantes, lorsqu'elles sont testées dans des échantillons à des concentrations de T4 libres d'env. 10 ng/L et 25 ng/L, conformément au protocole EP07-A2 du CLSI, n'ont provoqué aucune réactivité croisée jusqu'aux concentrations indiquées dans le tableau ci-dessous:

Substance Testée	Test Concentration [ng/L]	Réactivité croisée [%]
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (Reverse T3)	100 000	< 0,001
3,5-Dijodo-L-thyronin (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5'-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

9.3.2. Interférences

Les substances suivantes n'ont montré aucune interférence aux concentrations indiquées lors d'essais dans des échantillons présentant des concentrations de T4 libre d'environ 10 ng/L et 25 ng/L conformément au protocole EP07-A2 du CLSI. Un biais inférieur à 10 %* n'est pas considérée comme une interférence significative.

Substance Testée	Test Concentration
Bilirubine	200 µg/mL
Hémoglobine	2 mg/mL
Triglycérides	35 mg/mL
Albumine	63 mg/mL

* limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 %

L'étude d'un panel d'échantillons présentant un facteur rhumatoïde n'a pas permis de mettre en évidence de forte augmentation ou de diminution des taux de T4 libre faussement élevés en raison d'une interférence. Cependant, dans les essais immunologiques à base d'hormones libres, une interférence causée par des facteurs rhumatoïdes doit être envisagée.

9.4. Corrélation

Le test Free T4 ELISA a été comparé à un autre teste immunologique. 130 échantillons (les valeurs allaient d'environ 1 ng/L à environ 40 ng/L) ont été utilisés. La courbe de régression linéaire a été calculée.

$$y = 0,973 + 0,145x$$

$$R^2 = 0,917$$

9.5. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est 1,06 ng/L – 75 ng/L.

10. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

11. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'utilisation, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les Plaques de Microtitrage provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- L'ELISA est uniquement conçu pour le personnel qualifié suivant les normes de bonnes pratiques de laboratoire (Good Laboratory Practice, GLP).
- Pour un contrôle de qualité interne plus poussé, chaque laboratoire doit en outre utiliser des échantillons connus.

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

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3:1) ou du MIT (voir chapitre 3.1).

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.

Les réactifs peuvent contenir du 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (voir chapitre 3.1).

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

Attention



H315	Provoque une irritation cutanée.
H319	Provoque une sévère irritation des yeux
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.
P305+P351+P338	EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: Rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer.
P337+P313	Si l'irritation oculaire persiste: Consulter un médecin.

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

11.2. Elimination des déchets

Les résidus de produits chimiques et de préparations sont généralement considérés comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchets est réglementée par des lois et règlements nationaux et régionaux. Contactez les autorités locales ou les entreprises de gestion des déchets qui vous donneront des conseils sur la manière d'éliminer les déchets dangereux.

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

12. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF

FT41050

Free T4

(96 déterminations)

ITALIANO

1. USO PREVISTO

Il Free T4 ELISA è un kit per la determinazione quantitativa degli T4 libero (Tiroxina) nel siero o plasma (citrato, eparina) umano.

2. PRINCIPIO DEL TEST

La determinazione immunoenzimatica quantitativa degli anticorpi specifici si basa sulla tecnica competitiva ELISA (d'inglese Enzyme-linked immunosorbent assay).

Piastre di Microtitolazione sono rivestite con antigeni specifici che si legano agli anticorpi presenti nel campione. Il T4 libero dal campione compete con l'aggiunta di T4 coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per il legame degli anticorpi. Successivamente, tutto il materiale non legato viene rimosso mediante lavaggio. I complessi immunitari sono rilevati mediante colorazione blu dopo incubazione con soluzione di substrato di tetrametilbenzidina (TMB). L'intensità di questo prodotto di reazione è inversamente proporzionale alla quantità di T4 libera nel campione.

Acido solforico è aggiunto per bloccare la reazione. Questo produce un cambiamento di colore dal blu al giallo. Assorbanza a 450/620 nm è letto utilizzando un fotometro di Piastre di Microtitolazione ELISA.

3. MATERIALI

3.1. Reagenti forniti

- **Piastre di Microtitolazione:** 12 strisce divisibili in 8 pozzetti, rivestiti con anticorpi anti-T4; dentro una busta d'alluminio richiudibile.
- **SOLN STOP:** 1 flacone contenente 15 mL di acido solforico, 0,2 mol/L, pronto all'uso; tappo rosso.
- **WASH BUF 20x:** 1 flacone contenente 50 mL di un tampone fosfato concentrato 20 volte (0,2 M) per il lavaggio dei pozzetti; pH 7,2 ± 0,2; tappo bianco; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane.
- **Coniugato:** 1 flacone contenente 15 mL di T4 coniugato a perossidasi; colore rosso; pronto all'uso; tappo nero; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 flacone contenente 15 mL di 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto all'uso; tappo giallo.
- **Controllo:** 1 flacone contenente 1 mL; colore marrone chiaro; pronto all'uso; tappo bianco; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Standards:** 6 flaconi, contenenti 1 mL di sostanza standard, colore marrone chiaro, pronto all'uso; tappo giallo; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
 - Calibratore A: 0 ng/L
 - Calibratore B: 4 ng/L
 - Calibratore C: 10 ng/L
 - Calibratore D: 20 ng/L
 - Calibratore E: 35 ng/L
 - Calibratore F: 75 ng/L

Le indicazioni di pericolo e consigli di prudenza vedi capitolo 11.1.

3.2. Materials supplied

- 1 pellicola adesiva
- 1 istruzioni per l'uso

3.3. Materials and Equipment needed

- Fotometro per Piastre di Microtitolazione con filtri da 450/620 nm
- Incubatrice 37 °C
- Lavatore, manuale o automatico, di Piastre di Microtitolazione
- Micropipette per l'uso tra 50-100 µL
- Vortex-Mixer
- Acqua distillata
- Provette monouso

4. MODALITÀ DI CONSERVAZIONE

Conservare il kit a 2...8 °C. I reagenti aperti sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta quando sono conservati a 2...8 °C. Gli standard possono essere conservati per un massimo di 6 mesi dopo l'apertura.

5. PREPARAZIONE DEI REAGENTI

È molto importante, portare tutti i reagenti e campioni a temperatura ambiente (20...25°C) e mescolare prima di iniziare il test.

5.1. Piastre di Microtitolazione

Le strisce divisibili sono rivestite con anticorpi anti-T4. Immediatamente dopo la rimozione delle strisce necessari, le strisce rimanenti devono essere sigillare nuovamente in un foglio di alluminio insieme con il sacchetto di gel di silice conservati a 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluire **WASH | BUF | 20x** 1+19; per esempio. 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL di acqua distillata. Il Tampone diluito (**WASH | BUF | 1x**) è stabile per 5 giorni a temperatura ambiente (20...25 °C). Se cristalli appaiono nel concentrato, riscaldare la soluzione a 37 °C per esempio in un bagnomaria. Mescolare bene prima della diluizione.

5.3. **Standard**

Gli standard sono pronti per l'uso. Sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta. Una volta aperti, possono essere conservati per 6 mesi se conservati a 2...8 °C; ma non oltre la data di scadenza indicata sull'etichetta.

5.4. **SUB | TMB**

La soluzione sta pronta all'uso e deve essere conservata a 2...8 °C, al riparo dalla luce. **SUB | TMB** deve essere incolore o potrebbe avere un leggero colore blu chiaro. Se **SUB | TMB** diventa blu, potrebbe essere stato contaminato e non può essere utilizzato nel test.

6. PRELIEVO E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

Per questo test si prega di usare campioni di siero o plasma (citrato, eparina) umano. Se il test è fatto entro 5 giorni dal prelievo i campioni possono essere conservati tra 2...8 °C. Altrimenti devono essere aliquotati e congelati tra (-70...-20 °C). Se i campioni sono conservati congelati, mescolare bene i campioni scongelati prima del test. Evitare cicli ripetuti di congelamento/scongelo. L'inattivazione dei campioni per mezzo del calore non è raccomandata.

7. PROCEDIMENTO

Leggere bene le istruzioni per l'uso **prima** di iniziare il teste. L'affidabilità dei risultati dipende dalla stretta aderenza le istruzioni per l'uso di prova come descritto. La seguente procedura è stata **validata per l'esecuzione manuale**. Per un'esecuzione su strumentazione automatica si consiglia di aumentare il volume del **WASH | BUF | 1x** da 300 µL a 350 µL per evitare effetti di lavaggio. Prestare attenzione al capitolo 11. Stabilire innanzitutto il piano di distribuzione e identificazione dei campioni e standards/controlli (è raccomandato determinare in duplicato). Inserire i pozzetti necessari nel supporto.

Eseguire il test nell'ordine stabilito dalle istruzioni, senza ritardi.

Sul pipettaggio utilizzare puntali nuovi e puliti per ogni campione e standard/controllo.

Regolare l'incubatore a 37 ± 1°C.

1. Pipettare 50 µL di standard/controllo e di campione nei relativi pozzetti.
2. Pipettare 100 µL di Coniugato in tutti i pozzetti.
3. Coprire i pozzetti con la pellicola adesiva, fornita nel kit.
4. **Incubare 1 ora ± 5 min a 37 ± 1°C**. Non esporre a fonti di luce diretta.
5. Al termine dell'incubazione, togliere la pellicola e aspirare il liquido dai pozzetti. Successivamente lavare i pozzetti cinque volte con 300 µL di **WASH | BUF | 1x**. Evitare che la soluzione trabocchi dai pozzetti. L'intervallo tra il lavaggio e l'aspirazione deve essere > 5 sec. Dopo il lavaggio picchiettare delicatamente i pozzetti su una carta assorbente per togliere completamente il liquido, prima del passo successivo.
Attenzione: Il lavaggio è una fase molto importante. Da lavaggio insufficiente risulta una bassa precisione e risultati falsi!
6. Pipettare 100 µL **SUB | TMB** in tutti i pozzetti.
7. **Incubare precisamente per 15 min a temperatura ambiente (20...25 °C) al buio**. Un colore blu verifica a causa della reazione enzimatica.
8. Pipettare 100 µL **SOLN | STOP** in tutti i pozzetti, nello stesso ordine della **SUB | TMB**, in tal modo un cambiamento di colore dal blu al giallo si verifica.
9. Misurare l'assorbanza a 450/620 nm entro 30 min dopo l'aggiunta **SOLN | STOP**.

7.1. **Misurazione**

Misurare l'assorbanza di tutti i pozzetti a **450 nm** e registra i valori di assorbanza per ogni standard/controllo e campione.

È raccomandato fare le misurazioni delle onde **bichrome** (due colori). Utilizzando la lunghezza d'onda de 620 nm come misura di riferimento.

Dove sono state misurate in doppio, calcolare **la media delle assorbanze**.

8. RISULTATI

8.1. Validazione del test

Affinché un test possa essere considerato valido, le presenti istruzioni per l'uso devono essere rigorosamente seguite e devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- **Calibratore A:** Absorbance value > 1,000 e > Calibratore B
- **Calibratore B:** Absorbance value > Calibratore C
- **Calibratore C:** Absorbance value > Calibratore D
- **Calibratore D:** Absorbance value > Calibratore E
- **Calibratore E:** Absorbance value > Calibratore F
- **Calibratore F:** Absorbance value < 0,200
- **Controllo:** Risultati in ng/L entro dell'intervallo indicato sull'etichetta

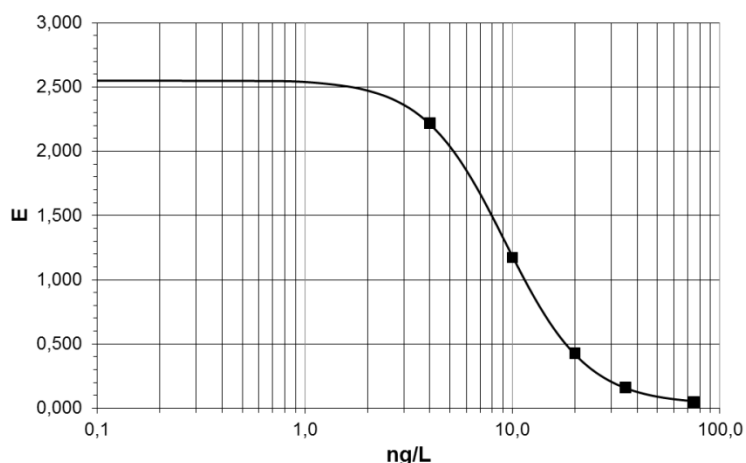
Calibratore A > Calibratore B > Calibratore C > Calibratore D > Calibratore E > Calibratore F

Se non sono soddisfatti questi criteri, il test non è valido e deve essere ripetuto.

8.2. Calcolo dei risultati

Per ottenere **risultati quantitativi in ng/L**, calcolare i valori di assorbanza (media) dei standard A-F (asse lineare y) rispetto alle corrispondenti concentrazioni (asse x logaritmico) e tracciare la curva di miglior adattamento (ad es. logistica dei 4 punti tracciati) attraverso i punti tracciati. Leggere i risultati di questa curva standard utilizzando i valori di assorbanza (media) di ciascun campione e controllo.

8.3. Tipica curva Standard



8.4. Interpretazione dei risultati

Gli intervalli di valori normali per questo ELISA dovrebbero essere stabiliti da ciascun laboratorio in base alle proprie popolazioni di pazienti nelle aree geografiche sottoposte a manutenzione.

I risultati del test devono essere verificati sull'intero stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione per la terapia deve essere presa individualmente.

La diagnosi di una malattia non deve essere stabilita sulla base di un singolo risultato del test. Una diagnosi precisa dovrebbe tenere conto della storia clinica, della sintomatologia e dei risultati di laboratorio.

8.4.1. Misura Normale

Un totale di 173 campioni di adulti apparentemente sani di 18 - 68 anni sono stati testati per stabilire l'intervallo di riferimento per il test Free T4 ELISA secondo la linea guida approvata CLSI EP28-A3c. L'intervallo di riferimento per Free T4 ELISA è risultato essere 7 - 22 ng/L in base al 95 % centrale della distribuzione di frequenza. Il valore medio, la deviazione standard e l'intervallo previsto sono:

	Media (ng/L)	SD	Intervallo (ng/L)
Adulti (n=173)	11,10	5,27	7-22

8.4.2. Campioni di donne in gravidanza

Campioni di donne in gravidanza apparentemente sane sono stati utilizzati per determinare i valori T4 liberi attesi per il test Free T4 ELISA durante la gravidanza. Il valore medio, la deviazione standard e l'intervallo previsto sono:

	Media (ng/L)	SD	Intervallo (ng/L)
Donne Incinta (n=30)	10,03	2,19	6-16

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

I risultati si riferiscono al gruppo di campioni investigato; questi non sono specifiche garantite.

9.1. Precisione

Intradosaggio	n	Media (E)	CV (%)
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28
Interdosaggio	n	Media (ng/L)	CV (%)
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

9.2. Sensibilità Analitica

Il limite di rilelabilità (d'inglese Limit of Detection LoD) per Free T4 ELISA è 1,06 ng/L, determinato in conformità con il protocollo EP17- A2 del CLSI in base alle proporzioni di falsi positivi (α) inferiori al 5 % e falsi negativi (β) inferiori di 5 %; utilizzando 240 determinazioni, con 120 campioni privi di analiti e 120 campioni di basso livello; e un bianco analitico (d'inglese Limit of Blank LoB) di 0,00 ng/L.

9.3. Specificità Analitica

9.3.1. Reattività Crociata

Le seguenti sostanze, se testate in campioni con concentrazioni di T4 libere di ca. 10 ng/L e 25 ng/L secondo il protocollo EP07-A2 del CLSI, non hanno causato cross-reattività fino alle concentrazioni indicate nella tabella seguente:

Sostanze Testate	Concentrazione del test [ng/L]	Reattività Crociata [%]
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (Reverse T3)	100 000	< 0,001
3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5'-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

9.3.2. Interferenze

Le seguenti sostanze, se testate in campioni con concentrazioni di T4 libere di ca. 10 ng/L e 25 ng/L secondo il protocollo EP07-A2 del CLSI, non sono stati trovati interferire alle concentrazioni indicate. Un errore sistematico (d'inglese Bias) inferiore al 10 %* non è considerato una interferenza significativa.

Sostanze Testate	Concentrazione del test
Bilirubina	200 μ g/mL
Emoglobina	2 mg/mL
Trigliceridi	35 mg/mL
Albumina	63 mg/mL

* limite superiore dell'intervallo di confidenza del 95 %

Lo studio di un panel di campioni positivi ai fattori reumatoidi non ha rivelato prove significative di livelli di T4 libero falsamente elevati o diminuiti a causa di interferenze. Tuttavia, nei test immunologici a base di ormoni liberi deve essere considerata l'interferenza causata da fattori reumatoidi.

9.4. Correlazione

Il Free T4 ELISA è stato confrontato con un'altro immunotest. Sono stati utilizzati 130 campioni (i valori variavano da circa 1 ng/L a circa 40 ng/L). La curva di regressione lineare è stata calcolata.

$$y = 0,973 + 0,145x$$

$$R^2 = 0,917$$

9.5. Campo di misura

Il campo di misura è 1,06 ng/L – 75 ng/L.

10. LIMITAZIONI

Una contaminazione da microorganismi o ripetuti cicli di congelamento-scongelo possono alterare i valori delle assorbanze.

11. PRECAUZIONI E AVVERTENZE

- La procedura analitica, le informazioni, le precauzioni e le avvertenze contenute nelle istruzioni per l'uso devono essere seguite scrupolosamente. L'uso dei kit con analizzatori e attrezzature similari deve essere previamente convalidato. Qualunque cambiamento nello scopo, nel progetto, nella composizione o struttura e nella procedura analitica, così come qualunque uso dei kit in associazione ad altri prodotti non approvati dal produttore non è autorizzato; l'utilizzatore stesso è responsabile di questi eventuali cambiamenti. Il produttore non è responsabile per falsi risultati e incidenti che possano essere causati da queste ragioni. Il produttore non è responsabile per qualunque risultato ottenuto attraverso esame visivo dei campioni dei pazienti.
- Solo per uso diagnostico in-vitro.
- Tutti i materiali di origine umana o animale devono essere considerati potenzialmente contagiosi e infettivi.
- Tutti gli elementi di origine umana sono stati trovati non reattivi con Anti-HIV-Ab, Anti-HCV-Ab e HBsAg.
- Non scambiare reagenti e Piastre di Microtitolazione di lotti diversi.
- Non utilizzare reagenti d'altri produttori insieme con i reagenti di questo kit.
- Non usare dopo la data di scadenza.
- Utilizzare soltanto punte per pipette, distributori, e articoli da laboratorio puliti.
- Non scambiare i tappi dei flaconi, per evitare contaminazione crociata.
- Richiudere i flaconi immediatamente dopo l'uso per evitare la vaporizzazione e contaminazione.
- Una volta aperti e dopo relativo stoccaggio verificare i reagenti per una loro eventuale contaminazione prima dell'uso.
- Per evitare contaminazioni crociate e risultati erroneamente alti pipettare i campioni e reagenti con molta precisione nei pozzetti senza spruzzi.
- L'ELISA è progettato solo per il personale qualificato che segue le norme di buona pratica di laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Per un ulteriore controllo di qualità interno ogni laboratorio dovrebbe inoltre utilizzare campioni noti..

11.1. Nota di sicurezza per i reagenti contenenti sostanze pericolose

I reagenti possono contenere CMIT/MIT (3:1) o MIT (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza.

Attenzione



H317	Può provocare una reazione allergica cutanea.
P261	Evitare di respirare gli aerosol.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P333+P313	In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico.
P362+P364	Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

I reagenti possono contenere 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxane (vedi capitolo 3.1).
Pertanto, si applicano le seguenti indicazioni di pericolo e le consigli di prudenza

Attenzione



H315	Provoca irritazione cutanea.
H319	Provoca grave irritazione oculare
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi.
P302+P352	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con sapone acqua.
P305+P351+P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: Sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
P337+P313	Se l'irritazione degli occhi persiste: Consultare un medico.

Ulteriori informazioni sono disponibili nella scheda di dati di sicurezza.

11.2. Smaltimento

I residui di prodotti chimici e preparati sono generalmente considerati come rifiuti pericolosi. Lo smaltimento di questo tipo di rifiuti è regolato da leggi e regolamenti nazionali e regionali. Contattare le autorità locali o le società di gestione dei rifiuti che daranno consigli su come smaltire i rifiuti pericolosi.

Per informazioni sui materiali d'imballaggio fare riferimento a MATERIALI D'IMBALLAGGIO.

12. INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

REF

FT41050

Free T4 (96 determinazioni)

ESPAÑOL

1. USO PREVISTO

El ensayo inmunoensayo Free T4 ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de T4 libre (tiroxina) en suero o plasma (citratado, heparinado) humano.

2. PRINCIPLE OF THE ASSAY

La determinación inmunoenzimática cuantitativa de T4 libre se basa en la técnica de competición ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Las Placas de Microtitulación están recubiertas con antígenos específicos unen a los anticuerpos de la muestra. La T4 libre de la muestra compete con la T4 conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) agregada para la unión del anticuerpo. Posteriormente, todo el material no unido se elimina mediante lavado. Los complejos inmunes se detectan mediante tinción azul después de la incubación con Solución de Sustrato de tetrametilbenzidina (TMB). La intensidad de este producto de reacción es inversamente proporcional a la cantidad de T4 libre en la muestra.

Se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. Esto produce un cambio de color de azul a amarillo. La extinción a 450/620 nm se mide con un fotómetro de Placa de Microtitulación ELISA.

3. MATERIALES

3.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pocillos rompibles, recubiertas con anticuerpos anti-T4, en bolsa de aluminio.
- **SOLN|STOP:** 1 botella de 15 mL de ácido sulfúrico, 0,2 mol/L, listo para ser utilizado; tapa roja.
- **WASH|BUF|20x:** 1 botella de 50 mL de una solución de tampón de fosfato 20x concentrado (0,2 M) para lavar los pocillos; pH 7,2 ± 0,2; tapa blanca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 botella conteniendo 15 mL de T4 conjugado con peroxidasa; color rojo; tapa negra; listo para ser utilizado; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB|TMB:** 1 botella de 15 mL 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; listo para ser utilizado; tapa amarilla.
- **Control:** 1 botella conteniendo 1 mL de solución color marrón claro, listas para ser utilizadas, tapa blanca; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Estándares:** 6 botellas, conteniendo cada una 1 mL de solución estándar, color marrón claro, listas para ser utilizadas, tapa amarilla; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
 - Estándar A: 0 ng/L
 - Estándar B: 4 ng/L
 - Estándar C: 10 ng/L
 - Estándar D: 20 ng/L
 - Estándar E: 35 ng/L
 - Estándar F: 75 ng/L

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 11.1.

3.2. Accesorios suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

3.3. Materiales e instrumentos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620 nm
- Incubadora 37°C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placas de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (50-100 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

4. ESTABILIDAD Y ALMACENAJE

Almacene el kit a 2...8 °C. Los reactivos abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacena a 2...8 °C. Los estándares pueden mantenerse por un máximo de 6 meses después de la apertura.

5. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante llevar todos los reactivos y las muestras para a la temperatura ambiente (20...25 °C) y mezclarlos antes de ser utilizados!

5.1. Placa de Microtitulación

Las tiras rompibles están recubiertas con anticuerpos anti-T4. Inmediatamente después de la eliminación de las tiras, las tiras restantes deben sellarse de nuevo en el papel de aluminio junto con la bolsita de dióxido de silicio y almacenar a 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluir **WASH | BUF | 20x** 1+19; por ejemplo 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL de agua destilada. El Tampón diluido (**WASH | BUF | 1x**) es estable durante 5 días a temperatura ambiente (20...25 °C). En caso de aparecer cristales en el concentrado, calentar la solución a 37 °C, por ejemplo, en un baño María. Mezclar bien antes de la dilución.

5.3. Estándares

Los estándares están listos para usar. Después de la primera apertura, permanecen estables durante 6 meses cuando se almacenan a 2...8 °C; pero no mayor a la fecha de caducidad indicada en la etiqueta.

5.4. **SUB | TMB**

La solución está lista para su uso y debe almacenarse a 2...8 °C, protegida de la luz. **SUB | TMB** debe ser incolora o podría tener un color ligeramente azul claro. Si **SUB | TMB** se convierte en azul, es posible que haya sido contaminado y no puede ser utilizado en el ensayo.

6. TOMA Y PRPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Usar muestras de suero o plasma (citrato, heparina) humano. Si el ensayo se realiza dentro de 5 días después de la toma de sangre, las muestras pueden ser almacenadas a 2...8 °C, en caso contrario deben ser alicuotadas y almacenadas congeladas (-70...-20 °C). Agitar bien las muestras descongeladas antes de diluirlas. Evitar congelaciones y descongelaciones repetidas. No se recomienda la inactivación por calor de las muestras.

7. PROCEDIMIENTO

Por favor, leer cuidadosamente las instrucciones de uso del ensayo **antes** de realizarlo. Para el buen funcionamiento de la técnica es necesario seguir las instrucciones. El siguiente procedimiento es válido solamente para el método manual. Si se realiza el ensayo en los sistemas automáticos de ELISA es aconsejable elevar el volumen de **WASH | BUF | 1x** de 300 µL a 350 µL para excluir efectos de lavado. Preste atención al capítulo 11. Antes de comenzar, especificar exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles (recomienda determinar en doble). Usar la cantidad necesaria de tiras o pocillos e insertarlos en el soporte.

Realizar el ensayo en el orden indicado y sin retraso.

Para cada paso de pipeteado en los estándares/controles y en las muestras, usar siempre puntas de pipeta de un solo uso.

Graduar la incubadora a 37 ± 1 °C.

1. Pipetear 50 µL de estándares/controles y muestras en los pocillos respectivos.
2. Pipetear 100 µL de conjugado en cada pocillo.
3. Recubrir las tiras con los autoadhesivos suministrados.
4. **Incubar 1 h ± 5 min a 37 ± 1 °C.** Evitar la luz solar directa.
5. Después de la incubación, retirar el autoadhesivo, aspirar el líquido de la tira y lavarla cinco veces con 300 µL del **WASH | BUF | 1x**. Evitar el rebosamiento de los pocillos. El intervalo entre lavado y aspiración debe ser > 5 segundos. Para sacar el líquido restante de las tiras, es conveniente sacudirlas sobre papel absorbente.
Nota: ¡El lavado es muy importante! Un mal lavado insuficiente provoca una baja precisión y resultados falsamente elevados!
6. Pipetar 100 µL de Solución de Sustrato de TMB en todos los pocillos.
7. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
8. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de la Solución de Parada en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con el Solución de Sustrato de TMB, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
9. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir la Solución de Parada.
10. Pipetar 100 µL **SUB | TMB** en todos los pocillos.
11. **Incubar exactamente 15 min en oscuridad a temperatura ambiente (20...25 °C).** Un color azul se produce en las muestras positivas debido a la reacción enzimática.
12. Pipetear en todos los pocillos 100 µL de **SOLN | STOP** en el mismo orden y mismo intervalo de tiempo como con **SUB | TMB**, por lo tanto un cambio de color de azul a amarillo se produce.
13. Medir la extinción con 450/620 nm en un periodo de 30 min después de añadir **SOLN | STOP**.

7.1. Medición

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

Es aconsejable realizar la medición **bicromática** a una longitud de onda de referencia de 620 nm.

Si se efectuaron análisis en duplicado o múltiples, hay que calcular **el promedio de los valores de extinción** de los pocillos correspondientes.

8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

8.1. Criterios de validez del ensayo

Para que un ensayo se considere válido, deben seguirse estrictamente las presentes instrucciones de uso y deben cumplirse los siguientes criterios:

- **Estándar A:** Valor de la extinción > 1,000 y > Estándar B
- **Estándar B:** Valor de la extinción > Estándar C
- **Estándar C:** Valor de la extinción > Estándar D
- **Estándar D:** Valor de la extinción > Estándar E
- **Estándar E:** Valor de la extinción > Estándar F
- **Estándar F:** Valor de la extinción < 0,200
- **Control:** Resultados en ng/L en el rango indicado en la etiqueta.

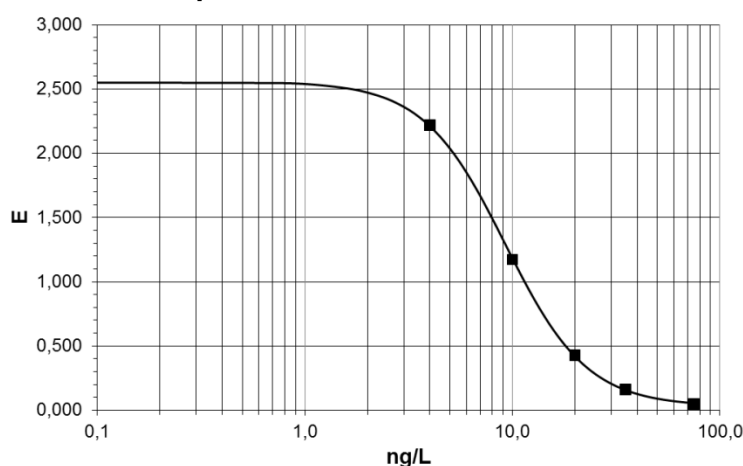
Estándar A > Estándar B > Estándar C > Estándar D > Estándar E > Estándar F

Si estos criterios no se cumplen, la prueba no es válida y deberá repetirse.

8.2. Cálculo de los Resultados

Para obtener **resultados cuantitativos en ng/L**, trace los valores de absorbancia (media) de los estándares A-F (eje-y lineal) contra sus concentraciones correspondientes (eje-x logarítmico) y dibuje la curva de mejor ajuste (por ejemplo, logística de cuatro parámetros) A través de los puntos trazados. Lea los resultados de esta curva estándar utilizando los valores de absorbancia (promedio) de cada muestra y control.

8.3. Curva típica de estándar



8.4. Interpretación de los Resultados

Los rangos de valores normales para este ensayo ELISA deben ser establecidos por cada laboratorio en función de sus propias poblaciones de pacientes en las áreas geográficas a las que se da servicio.

Los resultados de las pruebas deben verificarse con respecto al estado clínico completo del paciente. También cada decisión para la terapia debe tomarse individualmente.

El diagnóstico de una enfermedad no debe establecerse sobre la base de un único resultado de prueba. Un diagnóstico preciso debe tener en cuenta la historia clínica, la sintomatología y los hallazgos de laboratorio.

8.4.1. Rango Normal

Un total de 173 muestras de adultos aparentemente sanos de entre 18 y 68 años se analizaron para establecer el intervalo de referencia para el Free T4 ELISA de acuerdo con la directriz aprobada CLSI EP28-A3c. Se encontró que el intervalo de referencia para el Free T4 ELISA libre era de 7 a 22 ng/L basado en el 95 % central de la distribución de frecuencia. El valor medio, la desviación estándar y el rango esperado son:

	Promedio (ng/L)	SD	Rango (ng/L)
Adultos (n=173)	11,10	5,27	7-22

8.4.2. Muestras de mujeres embarazadas

Las muestras de gestantes aparentemente sanas se utilizaron para determinar los valores esperados de T4 libre para Free T4 ELISA durante la gestación. El valor medio, la desviación estándar y el intervalo esperado son:

	Promedio (ng/L)	SD	Rango (ng/L)
Gestantes (n=30)	10,03	2,19	6 - 16

9. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

9.1. Precisión

Intra ensayo	n	Promedio (E)	CV (%)
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28

Inter ensayo	n	Promedio (ng/L)	CV (%)
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

9.2. Sensibilidad analítica

El límite de detección (LOD, del inglés Limit of detection) para el Free T4 ELISA es de 1,06 ng/L, determinado de acuerdo con las pautas del documento EP17-A2 del CLSI basado en las proporciones de falsos positivos (α) menores al 5 % y falsos negativos (β) menores que 5 %; utilizando 240 determinaciones, con 120 muestras no analizadas o en blanco y 120 muestras de bajo nivel; y un límite de espacio en blanco (LoB, del inglés Limit of Blank) de 0,00 ng/L.

9.3. Especificidad analítica

9.3.1. Reactividad cruzada

Las siguientes sustancias, cuando se analizan en muestras con concentraciones de T4 libres de aprox. 10 ng/L y 25 ng/L según el protocolo EP07-A2 del CLSI, no causaron reactividad cruzada hasta las concentraciones indicadas en la siguiente tabla:

Substancias ensayadas	Ensayo Concentracion [ng/L]	Reactividad cruzada [%]
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (Reverse T3)	100 000	< 0,001
3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

9.3.2. Interferencias

Las siguientes sustancias, cuando se analizan en muestras con concentraciones de T4 libres de aprox. Se encontró que 10 ng/L y 25 ng/L según el protocolo EP07-A2 del CLSI no interfieren en las concentraciones indicadas. Un sesgo menor al 10 % * no se considera una interferencia significativa.

Substancias ensayadas	Ensayo Concentracion
Bilirrubina	200 µg/mL
Hemoglobina	2 mg/mL
Triglicéridos	35 mg/mL
Albúmina	63 mg/mL

* límite superior a 95 % intervalo de confianza

La investigación de un panel de muestras positivas de factor reumatoide no reveló pruebas significativas de niveles de T4 libres falsamente elevados o disminuidos debido a la interferencia. Sin embargo, en los inmunoensayos de hormonas libres debe considerarse la interferencia causada por factores reumatoides.

9.4. Correlación

El Free T4 ELISA fue comparado con otro inmunoensayo. Se utilizaron 130 muestras (los valores oscilaron entre aproximadamente 1 ng/L y aproximadamente 40 ng/L). Se calculó la curva de regresión lineal.

$$y = 0,973 + 0,145$$

$$R^2 = 0,917$$

9.5. Intervalo de medición

El intervalo de medición es 1,06 ng/L – 75 ng/L.

10. LIMITACIONES DEL ENSAYO

Una contaminación de las muestras con bacterias, o una congelación y descongelación repetida pueden producir cambios en los valores de la extinción.

11. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento, la información, las precauciones y los avisos de las instrucciones de uso han de ser seguidas estrictamente. La utilización de equipos con analizadores y equipamiento similar tiene que ser validada. No se autorizan cambios en el diseño, composición y procedimiento, así como cualquier utilización en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario debe hacerse responsable de estos cambios. El fabricante no responderá ante falsos resultados e incidentes debidos a estas razones. El fabricante no responderá ante cualquier resultado por análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Solo para diagnostico in vitro.
- Todos los materiales de origen humano o animal deberán ser considerados y tratados como potencialmente infecciosos.
- Todos los componentes de origen humano han sido examinados y resultaron no reactivos a anticuerpos contra el VIH, VHC y HbsAG.
- No intercambiar reactivos y Placa de Microtitulación de cargas diferentes.
- No usar reactivos de otro fabricante para este ensayo.
- No usar después de la fecha de caducidad.
- Sólo usar recambios de pipetas, dispensadores y materiales de laboratorio limpios.
- No intercambiar las tapas de los diferentes reactivos, para evitar la contaminación cruzada.
- Para evitar la evaporación y una contaminación microbiana, cierre inmediatamente las botellas después de usarlas.
- Después de abrirlas y posterior almacenaje, asegurarse de que no existe contaminación microbiana antes de seguir usándolas.
- Para evitar contaminaciones cruzadas y resultados erróneamente aumentados, Pipetear cuidadosamente las muestras y los reactivos en los pocillos sin salpicar.
- El ELISA sólo está diseñado para personal cualificado siguiendo las normas de buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice, GLP).
- Para un mayor control de calidad interno, cada laboratorio deberá utilizar además muestras conocidas.

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

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) o MIT (consulte el cap. 3.1).

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 aerosol.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón 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.

Los reactivos pueden contener 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (consulte el cap. 3.1).

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

Atención



H315	Provoca irritación cutánea.
H319	Provoca irritación ocular grave.
P280	Llevar guantes/ prendas de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con abundante jabón agua.
P305+P351+P338	EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.
P337+P313	Si persiste la irritación ocular: Consultar a un médico.

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

11.2. Indicaciones para la eliminación de residuos

Los residuos de productos químicos y preparados se consideran generalmente como residuos peligrosos. La eliminación de este tipo de residuos está regulada por leyes y reglamentos nacionales y regionales. Póngase en contacto con las autoridades locales o con las empresas de gestión de residuos, que le asesorarán sobre cómo eliminar los residuos peligrosos.

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

12. INFORMACIONES PARA PEDIDOS

REF

FT41050

Free T4

(96 determinaciones)

PORTUGUÊS

1. UTILIZAÇÃO PRETENDIDA

O kit Free T4 ELISA destina-se à determinação quantitativa de T4 livre (tiroxina) no soro ou plasma (citrato, heparina) humanos.

2. PRINCÍPIO DO ENSAIO

A determinação imunoenzimática quantitativa de T4 livre é baseado na técnica competitiva ELISA (do inglês Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

As Placas de Microtitulação são revestidas com anticorpos específicos anti-T4. O T4 livre da amostra compete com o conjugado de peroxidase de rábano silvestre (HRP) com T4 para a ligação do anticorpo. Subsequentemente, todo o material não ligado é removido por lavagem. Os complexos imunológicos são visualizados adicionando a solução de substrato de tetrametilbenzidina (TMB) que dá um produto de reação azul. A intensidade deste produto de reação é inversamente proporcional à quantidade de T4 livre na amostra. Absorvância a 450/620 nm é lida utilizando um fotômetro de Placa de Microtitulação ELISA.

3. MATERIAIS

3.1. Reagentes fornecidos

- **Placa de Microtitulação:** 12 tiras de 8 poços, destacáveis e quebráveis, revestidas com anticorpos anti-T4, em bolsas de folha de alumínio com fecho.
- **SOLN STOP:** 1 frasco contendo 15 mL ácido sulfúrico; 0,2 mol/L; pronto a usar; tampa vermelha.
- **WASH BUF 20x:** 1 frasco contendo 50 mL de um tampão fosfato (0,2 M); concentrado 20 vezes (pH 7,2 ± 0,2) para a lavagem dos poços; tampa branca; 0,2% (w/v) 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano.
- **Conjugado:** 1 frasco contendo 15 mL de T4 conjugado à peroxidase; de cor vermelha, pronto a usar; tampa preta; ≤ 0,02% (v/v) MIT.
- **SUB TMB:** 1 frasco contendo 15 mL de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), < 0,1 %; pronto a usar; tampa amarela.
- **Controle:** 1 frasco contendo 1 mL de substância de cor marrom clara; pronto para usar, tampa branca; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Standardes:** 6 frascos, contendo 1 mL de solução de standardes, de cor marrom clara; prontos a usar, tampa amarela; ≤ 0,01% (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
 - Standard A: 0 ng/L
 - Standard B: 4 ng/L
 - Standard C: 10 ng/L
 - Standard D: 20 ng/L
 - Standard E: 35 ng/L
 - Standard F: 75 ng/L

Para advertências de perigo e recomendações de prudência ver capítulo 11.1.

3.2. Materiais fornecidos

- 1 Película de cobertura
- 1 Instruções de utilização

3.3. Materiais e Equipamento necessários

- Fotômetro de Placa de Microtitulação ELISA, equipado para a medição da absorvância a 450/620 nm
- Incubadora 37 °C
- Equipamento manual ou automático para a lavagem de Placas de Microtitulação
- Pipetas para dispensar volumes entre 50 e 100 µL
- Agitador de tubos tipo Vortex
- Água destilada
- Tubos descartáveis

4. ESTABILIDADE E ARMAZENAMENTO

Armazene o kit a 2...8 °C. Os reagentes abertos são estáveis até o prazo de validade impresso no rótulo, quando armazenado a 2...8 °C. Os Standardes podem ser mantidos por no máximo 6 meses após a abertura.

5. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

É muito importante deixar todos os reagentes e amostras estabilizar à temperatura ambiente (20...25 °C) e misturá-los antes de iniciar o teste!

5.1. Placa de Microtitulação

As tiras quebráveis são revestidas com anticorpos anti-T4. Imediatamente após a remoção das tiras necessárias, as tiras restantes devem ser lacradas de novo na folha de alumínio juntamente com o saquinho de silício fornecido e armazenadas a 2...8 °C.

5.2. **WASH | BUF | 20x**

Diluir **WASH | BUF | 20x** 1+19; por exemplo, 10 mL **WASH | BUF | 20x** + 190 mL de água destilada. O Tampão diluído (**WASH | BUF | 1x**) é estável durante 5 dias à temperatura ambiente (20...25 °C). Caso apareça cristais no concentrado, aquecer a solução a 37 °C por exemplo, em banho Maria. Misture bem antes da diluição.

5.3. **Standardes**

Os Standardes estão prontos para uso. Após a primeira abertura, eles permanecem estáveis por 6 meses quando armazenados a 2...8 °C; mas não mais do que o prazo de validade indicado no rótulo.

5.4. **SUB | TMB**

A Solução está pronta para uso e tem de ser armazenada à 2...8 °C, protegida da luz. **SUB | TMB** deve ser incolor ou poderia ter uma ligeira coloração azul claro. Se **SUB | TMB** se transforma em azul, pode ter sido contaminado e não pode ser usado no teste.

6. COLHEITA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Usar com este ensaio amostras de soro ou plasma (citrato, heparina) humanos. Se o ensaio for realizado dentro de 5 dias após colheita da amostra, o espécime deve ser mantido a 2...8 °C; caso contrário devem ser alicotadas e armazenadas congeladas (-70...-20 °C). Se as amostras forem armazenadas congeladas, misturar bem as amostras descongeladas antes de testar. Evitar congelar e descongelar repetidamente.

Não é recomendada a inactivação por calor das amostras.

7. PROCEDIMENTO DO ENSAIO

Por favor, ler atentamente as instruções de uso **antes** de realizar o teste. A fiabilidade dos resultados depende da adesão estrita ao as instruções de utilização, conforme descritas. O procedimento de ensaio a seguir está validado apenas para o procedimento manual. Se o teste for realizado em sistemas automáticos para teste ELISA é recomendável aumentar o volume do **WASH | BUF | 1x** de 300 µL para 350 µL para evitar efeitos de lavagem. Preste atenção ao capítulo 11. Antes de iniciar o teste, o plano de distribuição e identificação de todas as amostras e Standardes/controles (é recomendado determinar em duplicidade) deve ser cuidadosamente estabelecido. Seleccionar o número necessário de tiras ou poços e inserir os mesmos no suporte.

Realizar todas as etapas do teste na ordem indicada e sem atrasos significativos.

Na pipetagem deve ser utilizada uma ponta limpa e descartável para dispensar cada controle e amostra.

Ajustar a incubadora para 37 ± 1°C.

1. Dispensar 50 µL dos standardes/controles e das amostras nos poços respectivos.
2. Dispensar 100 µL de Conjugado em todos os poços.
3. Cobrir os poços com a película fornecida no kit.
4. **Incubar durante 1 hora ± 5 min a 37 ± 1°C.** Não expor diretamente à luz solar.
5. Quando terminar a incubação, remover a película, aspirar o conteúdo dos poços e lavar cada poço cinco vezes com 300 µL **WASH | BUF | 1x**. Evitar que os poços de reacção transbordem. O intervalo entre a lavagem e a aspiração deve ser > 5 seg. No final, retirar cuidadosamente o fluido restante batendo delicadamente as tiras sobre papel absorvente, antes da próxima etapa!

Nota: A lavagem é muito importante! Lavagem insuficiente resulta em baixa precisão e falsos resultados.

6. Dispensar 100 µL **SUB | TMB** em todos os poços.
7. **Incubar durante exactamente 15 min à temperatura ambiente (20...25°C) e no escuro.** A cor azul devido a uma reacção enzimática.
8. Dispensar 100 µL **SOLN | STOP** em todos os poços, pela mesma ordem e com a mesma velocidade a que foi dispensada a **SUB | TMB**, desse modo uma mudança de cor de azul para amarelo ocorre.
9. Medir a absorvância a 450/620 nm dentro de 30 min após a adição **SOLN | STOP**.

7.1. **Medição**

Medir a absorvância de todos os poços a **450 nm** e registar os valores da absorvância para cada Standard/controle e amostra.

É recomendado fazer a medição **dicromática** usando como referência um comprimento de onda de 620 nm.

Se determinações duplas foram realizadas, calcular **os valores médios de absorvância**.

8. RESULTADOS

8.1. Critérios de validação do ensaio

Para que um ensaio seja considerado válido, estas instruções de utilização devem ser rigorosamente seguidas, e os seguintes critérios devem ser cumpridos:

- **Standard A:** Valor de Absorvância > 1,000 e > Estándar B
- **Standard B:** Valor de Absorvância > Estándar C
- **Standard C:** Valor de Absorvância > Estándar D
- **Standard D:** Valor de Absorvância > Estándar E
- **Standard E:** Valor de Absorvância > Estándar F
- **Standard F:** Valor de Absorvância < 0,200
- **Control:** Resultados em ng/L dentro do intervalo indicado na etiqueta.

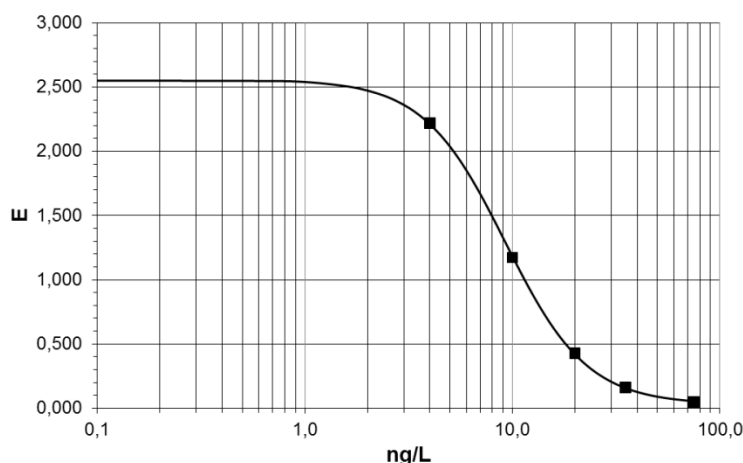
Standard A > Standard B > Standard C > Standard D > Standard E > Standard F

Se estes critérios não forem cumpridos, o teste não é válido e deve ser repetido.

8.2. Cálculo dos Resultados

Para obter **resultados quantitativos em ng/L** plote os valores (médios) de absorvância Standardes A-F (eixo linear y) contra suas respectivas concentrações (eixo logarítmico) e desenhe a curva de melhor ajuste (por exemplo, Logística de Quatro Parâmetros) através dos pontos plotados. Leia os resultados dessa curva Standard empregando os valores de absorvância (média) de cada amostra e controle.

8.3. Curva de Standard típica



8.4. Interpretação dos Resultados

As faixas de valores normais para este ELISA devem ser estabelecidas por cada laboratório com base em suas próprias populações de pacientes nas áreas geográficas atendidas.

Os resultados dos testes devem ser verificados em relação a todo o estado clínico do paciente. Também toda decisão de terapia deve ser tomada individualmente.

O diagnóstico de uma doença não deve ser estabelecido com base em um único resultado de teste. Um diagnóstico preciso deve levar em consideração a história clínica, a sintomatologia e os achados laboratoriais.

9.4.1. Intervalo Normal em um total

Um total de 173 amostras de adultos aparentemente saudáveis com idades entre 18 e 68 anos foi analisado para estabelecer o intervalo de referência para o Free T4 ELISA de acordo com a diretriz aprovada CLSI EP28-A3c. O intervalo de referência para o ELISA T4 Livre foi encontrado em 7–22 ng/L com base na distribuição central de 95 % da frequência. O valor médio, o desvio padrão e o intervalo esperado são:

	Média (ng/L)	SD	Intervalo ng/L
Adulto (n=173)	11,10	5,27	7-22

9.4.2. Amostras de mulheres grávidas

Amostras de gestantes aparentemente saudáveis foram utilizadas para determinar os valores esperados de T4 livre para o Free T4 ELISA durante a gestação. O valor médio, o desvio padrão e o intervalo esperado são:

	Média (ng/L)	SD	Intervalo ng/L
Gestantes (n=30)	10,03	2,19	6-16

9. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO ESPECÍFICAS

Os resultados referem-se aos grupos de amostras investigados; estas não são especificações garantidas.

9.1. Precisão

Intra ensaio	n	Média (E)	CV (%)
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28
Inter ensaio	n	Média (ng/L)	CV (%)
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

9.2. Sensibilidade analítica

O Limite de Detecção (LoD) para o Free T4 ELISA é 1,06 ng/L, determinado de acordo com as diretrizes do documento EP17-A2 do CLSI, com base nas proporções de falsos positivos (α) menores que 5 % e falsos negativos (β) menores que 5 %; usando 240 determinações, com 120 amostras sem analitos e 120 amostras de baixo nível; e um Limit of Blank (LoB) de 0,00 ng/L.

9.3. Especificidade Analítica

9.3.1. Reação Cruzada

As seguintes substâncias, quando testadas em amostras com concentrações de T4 livres de aprox. 10 ng/L e 25 ng/L de acordo com o protocolo EP07-A2 do CLSI, não causaram nenhuma reação cruzada até as concentrações indicadas na tabela abaixo:

Substâncias Testadas	Concentração de test [ng/L]	Reação Cruzada [%]
3,3',5-Triiodo-L-thyronine (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (Reverse T3)	100 000	< 0,001
3,5-Diiodo-L-thyronine (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

9.3.2. Interferências

As seguintes substâncias, quando testadas em amostras com concentrações de T4 livres de aprox. Observou-se que 10 ng/L e 25 ng/L de acordo com o protocolo EP07-A2 do CLSI não interferiram nas concentrações indicadas. Um desvio inferior a 10 %* não é considerado uma interferência significativa.

Substâncias Testadas	Test Concentrações
Bilirrubina	200 µg/mL
Hemoglobina	2 mg/mL
Triglicéridos	35 mg/mL
Albumina	63 mg/mL

* limite superior a 95 % interval de confiança

A investigação de um painel de amostras positivas para fator reumatóide não revelou evidências significativas de níveis de T4 livre falsamente elevados ou diminuídos devido à interferência. Entretanto, em imunoenaios com hormônios livres, a interferência causada por fatores reumatóides deve ser considerada.

9.4. Correlação

O Free T4 ELISA foi comparado com outro imunoensaio. 130 amostras foram usadas (os valores variaram de aproximadamente 1 ng/L a aproximadamente 40 ng/L). A curva de regressão linear foi calculada.

$$y = 0,973 + 0,145x$$

$$R^2 = 0,917$$

9.5. Intervalo de medição

O intervalo de medição é 1,06 ng/L – 75 ng/L.

10. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Contaminação bacteriana ou a repetição de ciclos de congelação-descongelação do espécime podem afectar os valores da absorvância.

11. PRECAUÇÕES E AVISOS

- O procedimento do teste, as informações, as precauções e avisos nas instruções de utilização têm de ser rigorosamente seguidas. O uso de kits de teste com analisadores e equipamento similar tem de ser validado. Qualquer alteração no desenho, composição e procedimento do teste bem como qualquer utilização em combinação com outros produtos não aprovados pelo fabricante não estão autorizados; o próprio utilizador é responsável por tais alterações. O fabricante não é legalmente responsável por resultados falsos e incidentes originados por estes motivos. O fabricante não é legalmente responsável por quaisquer resultados obtidos por análise visual das amostras dos pacientes.
- Apenas para uso no diagnóstico in-vitro.
- Todos os materiais de origem humana ou animal devem ser considerados e tratados como potencialmente infectantes.
- Todos os componentes de origem humana usados para a produção destes reagentes foram testados para anticorpos anti-HIV, anticorpos anti-HCV e HBsAg e foram considerados não-reactivos.
- Não trocar e juntar reagentes ou Placas de Microtitulação de lotes de produção diferentes.
- Nenhum reagentes de outros fabricantes devem ser usados juntamente com reagentes deste kit de teste.
- Não usar reagentes após a data de validade indicada no rótulo.
- Usar apenas pontas de pipeta, dispensadores e material de laboratório limpos.
- Não trocar as tampas dos frascos dos reagentes para evitar contaminação cruzada.
- Fechar firmemente os frascos dos reagentes imediatamente após a utilização para evitar evaporação e contaminação microbiana.
- Após a primeira abertura e armazenamento subsequente verificar se existe contaminação microbiana dos frascos do conjugado e dos Standardes/controles antes de utiliza-los novamente.
- Para evitar contaminação-cruzada e resultados falsamente elevados, pipetar as amostras dos pacientes e dispensar o reagentes precisamente nos poços sem salpicar.
- O ELISA foi desenhado apenas para pessoal qualificado e que esteja familiarizado com boas práticas laboratoriais

11.1. Nota de segurança para reagentes que contenham substâncias perigosas

Os reagentes podem conter CMIT/MIT (3:1) ou MIT (ver capítulo 3.1).

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H317	Pode provocar uma reacção alérgica cutânea.
P261	Evitar respirar os aerossóis.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água
P333+P313	Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico.
P362+P364	Retirar a roupa contaminada e lavá-la antes de a voltar a usar.

Os reagentes podem conter 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano (ver capítulo 3.1).

Portanto, as seguintes advertências de perigo e recomendações de prudência aplicam-se.

Atenção



H315	Provoca irritação cutânea.
H319	Provoca irritação ocular grave.
P280	Usar luvas de protecção/ vestuário de protecção.
P302+P352	SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar abundantemente com sabão água.
P305+P351+P338	SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: Enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.
P337+P313	Caso a irritação ocular persista: Consulte um médico.

Mais informações podem ser encontradas na ficha de dados de segurança.

11.2. Considerações de Eliminação

Os resíduos de produtos químicos e preparações são geralmente considerados como resíduos perigosos. A eliminação deste tipo de resíduos é regulamentada através de leis e regulamentos nacionais e regionais. Contacte as suas autoridades locais ou empresas de gestão de resíduos que darão conselhos sobre como eliminar os resíduos perigosos.

Para informações sobre os materiais de embalagem, consulte MATERIAIS DE EMBALAGEM.

12. INFORMAÇÃO DE PEDIDO

REF

FT41050


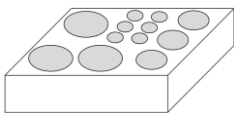




Free T4

(96 Determinações)





















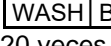
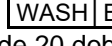



ABBREVIATIONS / ABKÜRZUNGEN / ABRÉVIATIONS / ABBREVIAZIONI / ABREVIACIONES / ABREVIATURAS

CMIT	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one
MIT	2-methyl-2H-isothiazol-3-one
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute

PACKAGING MATERIALS / VERPACKUNGSMATERIALIEN / MATÉRIELS D'EMBALLAGE / MATERIALI D'IMBALLAGGIO / MATERIALES DE EMBALAJE / MATERIAIS DE EMBALAGEM

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22
SOLN STOP WASH BUF 20x SUB TMB CONJS CAL CONTROL		MTP
 HDPE 2	 PP 5	 PET / ALU / LDPE 90

SYMBOLS KEY / SYMBOLSCHLÜSSEL / EXPLICATION DES SYMBOLES / LEGENDA / SIMBOLOS / TABELA DE SIMBOLOS

	Manufactured by / Hergestellt von / Fabriqué par / Prodotto da / Fabricado por / Fabricado por
	In Vitro Diagnostic Medical Device / In Vitro Diagnosticum / Dispositif médical de diagnostic in vitro / Diagnostico in vitro / Producto para diagnóstico In vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro
	Lot Number / Chargenbezeichnung / Numéro de lot / Lotto / Número de lote / Número de lote
	Expiration Date / Verfallsdatum / Date de péremption / Scadenza / Fecha de caducidad / Data de Validade
	Storage Temperature / Lagertemperatur / Température de conservation / Temperatura di conservazione / Temperatura de almacenamiento / Temperatura de Armazenamento
	CE marking / CE-Kennzeichnung / Marquage CE / Marchio CE / Marca CE / Marca CE
	Unique Device Identifier / Eindeutige Produktidentifizierung / identification unique des dispositifs / identificazione unica del dispositivo / identificación única del producto / identificação única dos dispositivos
	Catalogue Number / Katalog Nummer / Référence du catalogue / Numero di codice / Número de Catálogo / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Gebrauchsanweisung beachten / Consulter la notice d'utilisation / Consultare le istruzioni per l'uso/ Consulte las Instrucciones de Uso / Consultar as Instruções de Utilização
	Microtiterplate / Mikrotiterplatte / Plaque de Microtitrage / Piastre di Microtitolazione / Placa de Microtitulacions / Placa de Microtitulação
	Conjugate / Konjugat / Conjugué / Coniugato / Conjugado / Conjugado
	Control / Kontrolle / Contrôle / Controllo / Control/ Controle
	Standard or Calibrator A-F / Standard oder Kalibrator A-F / Standard o Etalon A-F / Standard o Calibratore A-F / Estándar o Calibrador A-F / Standard ou Calibrador A-F
	Stop Solution / Stopplösung / Solution d'Arrêt / Soluzione Bloccante / Solución de Parada / Solução de Bloqueio
	TMB Substrate Solution / TMB-Substratlösung / Solution de Substrat TMB / Soluzione Substrato TMB / Solución Substrato TMB / Solução Substrato TMB
	“Washing Buffer (20x concentrated)”;  W0000 Washing Buffer 20x concentrated / Waschpuffer 20x konzentriert / Tampon de Lavage concentré 20 x / Tampone di Lavaggio concentrazione x20 / Tampone di Lavaggio concentrado x20 / Tampão de Lavagem concentrada 20x
	20-fold dilution of  / 20-fach Verdünnung von  / Dilution 20 fois du  / Diluizione 20 volte del  / Dilución de 20 veces del  / Diluição de 20 dobras do 
	Contains sufficient for “n” tests / Ausreichend für “n” Tests / Contenu suffisant pour “n” tests / Contenuto sufficiente per “n” saggi / Contenido suficiente para “n” tests / Conteúdo suficiente para “n” testes

SCHEME OF THE ASSAY

Free T4

Test Preparation

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

Assay Procedure

	Standard A - F	Control	Sample
Standard A - F	50 µL	-	-
Control	-	50 µL	-
Sample	-	-	50 µL
Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 1 h at 37 ± 1 °C Do not expose to direct sunlight Wash each well five times with 300 µL of WASH BUF 1x			
SUB TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for exactly 15 min at room temperature (20...25 °C) in the dark			
SOLN STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Photometric measurement at 450 nm (reference wavelength: 620 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

FT41050_IFU_rev01_fromLot_031N