



DCM045-10
Ed. 01/2015

T4 ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della tiroxina (T4) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO045

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di tiroxina (T4) in siero o plasma umano.

Il kit T4 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone tiroideo, tiroxina (T4) è prodotto dalla ghiandola tiroide. Un componente importante nella sintesi è lo iodio. La forma maggiormente presente nel sangue degli ormoni tiroidei, è la tiroxina (T4). La tiroxina è convertita in T3 attivo (tre - quattro volte più potente di T4) all'interno delle cellule dalla deiodinasi (5'-iodinasi). La Tiroxine-binding globulin (TGB) è la proteina carrier per l'ormone tiroideo circolante. Soltanto una frazione molto piccola dell'ormone è libera - T4 0,03%.

Gli ormoni tiroidei agiscono sull'organismo in modo da aumentare il metabolismo basale, interessano la sintesi proteica ed aumentano la sensibilità del corpo alle catecolammine (quali l'adrenalina). Gli ormoni tiroidei sono essenziali per lo sviluppo e il differenziamento delle cellule del corpo umano.

Questi ormoni inoltre regolano il metabolismo delle proteine, dei grassi e dei carboidrati, sono coinvolte nella regolazione del uso dei residui energetici da parte delle cellule. Stimoli fisiologici e patologici influenzano la sintesi dell'ormone tiroideo.

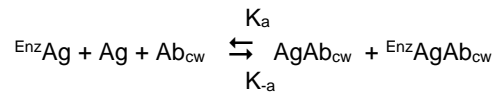
Gli ormoni tiroidei agiscono attraverso un meccanismo sconosciuto per inibire l'attività neuronale; uno degli effetti è il calo della temperatura corporea. Tireotossicosi o ipertiroidismo è la sindrome clinica causata da un eccesso di tiroxina o triiodotironina (o entrambi) libera in circolazione.

Sia il T3 che T4 sono impiegati nel trattamento della carenza degli ormoni tiroidei (ipotiroidismo).

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il T4 (T4, antigene) presente nel campione, compete con il T4 antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-T4 adsorbito su micropietra (fase solida) (il coniugato non deve avere legami misurabili con le proteine del siero specialmente TBG e albumina).

L'interazione è illustrata dalla equazione seguente:



Ab_{cw}: anticorpo monospecifico immobilizzato (quantità costante)

Ag: antigene nativo (quantità variabile)

EnzAg: antigene coniugato a enzima HRP (quantità costante)

Ag Ab_{cw}: complesso antigene-anticorpo

EnzAgAb_{cw}: complesso antigene-anticorpo-enzima HRP

K_a: costante di associazione

K_{-a}: costante di dissociazione

K = k_a / k_{-a}: costante di equilibrio

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

L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H₂SO₄).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di T4 presente nel campione. La concentrazione di T4 nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0

REF DCE002/4506-0

CAL1

REF DCE002/4507-0

CAL2

REF DCE002/4508-0

CAL3

REF DCE002/4509-0

CAL4

REF DCE002/4510-0

CAL5

REF DCE002/4511-0

2. Conjugate Buffer (1 flacone, 12,5 mL)

Soluzione tampone con conservanti e inibitori delle proteine di legame

REF DCE002/4501-0

3. Conjugate (1 flacone, 1,4 mL)

T4 coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

(**proteggere dalla luce solare**)

REF DCE002/4502-0

4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Anticorpo anti T4 adsorbito sulle micropiastre

REF DCE002/4503-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE004-0
6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
 Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)
REF DCE005-0
7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
 NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF** DCE006-0

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

Note

Conservare i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su Esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- La concentrazione della Tiroxina totale nel siero dipende da molteplici fattori: dalla funzionalità della ghiandola tiroidea e dalla sua regolazione, Tiroxina Legante Globulina (TBG), e dal legame della tiroxina alla TBG. Tuttavia, la concentrazione della tiroxina totale non è sufficiente da sola a monitorare lo stato clinico.
- I valori della tiroxina totale nel siero possono aumentare in gravidanza o per somministrazione di contraccettivi orali. La tabella di droghe interferenti e le condizioni nella quale i valori di tiroxina totale sono influenzati sono stati compilati dal Journal of the American Association of Clinical Chemists.

- Non usare per lo screening dei neonati.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono tarati contro "Human Serum Reference" di tiroxina ed hanno concentrazioni approssimative di:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| µg/dL | 0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 25,0 |

La concentrazione dei Calibratori è lotto-specifica; i valori esatti sono riportati nelle etichette e nel Certificato di Analisi per ogni specifico lotto.

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Diluire il Coniugato 1:11 con il Conjugate Buffer. Ad esempio diluire 160 µL di Coniugato in 1,6 mL di Conjugate Buffer. Usare entro 24 ore per ottenere le massime prestazioni dal dosaggio. Mantenere ad una temperatura di 2÷8°C.

NOTA IMPORTANTE: esposizioni prolungate del Coniugato alla luce solare possono influenzare le caratteristiche funzionali del dosaggio; pertanto non esporre il Coniugato (e il Coniugato diluito) a luce solare diretta.

6.3. Preparazione della Wash Solution

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

6.4. Preparazione del campione

La determinazione del T4 si effettua su siero o plasma umano. I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C (per un periodo massimo di 48 ore).

Se non può essere testato entro le 48 ore, conservare il campione a -20°C fino a 30 giorni. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Se testato in duplicato sono necessari 0,050 mL di campione.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

| Reagente | Calibratore | Campione /Controllo | Bianco |
|---|-------------|---------------------|--------|
| Campione /Controllo | | 25 µL | |
| Calibratore C ₀ -C ₅ | 25 µL | | |
| Coniugato diluito | 100 µL | 100 µL | |
| Incubare 1 ora a temperatura ambiente (22÷28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. | | | |
| Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. | | | |
| Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi. | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubare a temperatura ambiente (22÷28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce. | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti. | | | |

7. CONTROLLO QUALITA'

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

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

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Uno studio di popolazione adulta eutiroide è stata utilizzata per determinare i valori attesi per il T4 ELISA kit.

| | Media (µg/dL) | SD | Range (µg/dL) |
|----------------|---------------|-----|---------------|
| Valori normali | 7,6 | 1,6 | 4,4 - 10,8 |

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

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti controlli. La variabilità intra-assay è ≤ 8,16%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti controlli con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è ≤ 8,42%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 1,25 - 2,50 - 5,00 - 10,00 µg/dL di T4, ha dato un valore medio (±SD) di 97,8% ± 5%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di T4 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,4 µg/dL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

La cross-reattività dell'anti-tiroxina verso determinate sostanze è stata determinata aggiungendo le

soluzioni interferenti a una matrice di siero a varie concentrazioni. La cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra la concentrazione di sostanze interferenti e la concentrazione di Tiroxina necessaria per spiazzare la stessa quantità di coniugato.

| Sostanza | Cross Reattività | Concentrazione |
|---------------------------|------------------|----------------|
| I-Thyroxine | 1,0000 | - |
| d-Thyroxine | 0,9800 | 10 µg/dL |
| I-Triiodo-thyronine | 0,0300 | 100 µg/dL |
| d-Triiodo-thyronine | 0,0150 | 100 µg/dL |
| Monoiodo-Tyrosine | N/D | 100 µg/mL |
| Diiodo-Tyrosine | N/D | 100 µg/mL |
| Triiodothyroacetic Acid | N/D | 100 µg/mL |
| Tetraiodothyroacetic Acid | 0,0001 | 100 µg/mL |

10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Diametra T4 ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 114 campioni di siero. La curva di regressione è:
(T4 Diametra) = 0,959*(T4 RIA) + 0,339
r² = 0,936

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

- Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine" Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948).
- Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine," J.Clinical Endocrinol., 33, 865 (1971).
- Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on clinical Laboratory Tests." Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975).
- Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC press, P.19-51 (1975).

Ed. 01/2015

DCM045-10

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM045-10
Ed. 01/2015

T4 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of thyroxine (T4) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO045

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of thyroxine (T4) concentration in human serum and plasma.

T4 ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

Thyroxine-binding globulin (TGB) is the major carrier protein for circulating thyroid hormone. Only a very small fraction of the circulating hormone is free (unbound) - T4 0.03%.

The thyronines act on the body to increase the basal metabolic rate, affect protein synthesis and increase the body's sensitivity to catecholamines (such as adrenaline) by permissiveness. The thyroid hormones are essential to proper development and differentiation of all cells of the human body. These hormones also regulate protein, fat, and carbohydrate metabolism, affecting how human cells use energetic compounds. Numerous physiological and pathological stimuli influence thyroid hormone synthesis.

Thyroid hormones act through an unknown mechanism to inhibit neuronal activity; one of the effects is the reduction of the body temperature.

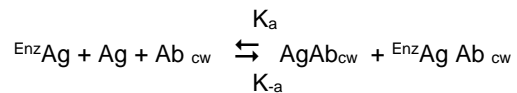
Thyrotoxicosis or hyperthyroidism is the clinical syndrome caused by an excess of circulating free thyroxine, free triiodothyronine, or both.

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

2. PRINCIPLE

The T4 (antigen) in the sample competes with the antigenic T4 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti T4 coated on the microplate (solid phase) (the enzyme conjugate should have no measurable binding to serum proteins especially TBG and albumin).

The interaction is illustrated through the following equation:



Ab_{cw}: monospecific immobilised antibody (constant quantity)

Ag: native antigen (variable quantity)

EnzAg: antigen conjugated to enzyme HRP (constant quantity)

Ag Ab_{cw}: antigen-antibody complex

EnzAg Ab_{cw}: antigen-HRP-antibody complex

K_a: rate constant of association

K_{-a}: rate constant of disassociation

K = k_a / k_{-a}: equilibrium constant

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

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the T4 concentration of in the sample. T4 concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

| | | |
|------|-----|---------------|
| CAL0 | REF | DCE002/4506-0 |
| CAL1 | REF | DCE002/4507-0 |
| CAL2 | REF | DCE002/4508-0 |
| CAL3 | REF | DCE002/4509-0 |
| CAL4 | REF | DCE002/4510-0 |
| CAL5 | REF | DCE002/4511-0 |

2. Conjugate Buffer (1 vial, 12.5 mL)

Buffered solution with preservative and binding protein inhibitors **REF DCE002/4501-0**

3. Conjugate (1 vial, 1.4 mL)

T4 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) **(keep away from sunlight)** **REF DCE002/4502-0**

4. Coated Microplate (1 microplates breakable)

Anti T4 antibody adsorbed on microplates **REF DCE002/4503-0**

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (*avoid any skin contact*)
REF DCE004-0
6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)
REF DCE005-0
7. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store the reagents at 2-8°C in the dark. Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- The concentration of total thyroxine in serum depends on several factors: the function of the thyroid gland and its regulation, thyroxine binding globulin (TBG) and thyroxine binding to TBG. However, the concentration of total thyroxine alone is not sufficient to monitor the clinical status.
- Total serum thyroxine values may increase during pregnancy or administration of oral contraceptives. The table of drugs and interfering conditions in which the values of total thyroxine are affected have been compiled by the Journal of the American Association of Clinical Chemists.
- Not intended for newborn screening

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.

- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The serum are ready to use, are calibrated against Human Serum Reference for thyroxine and have approximate concentrations of:

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| µg/dL | 0 | 2.0 | 5.0 | 10.0 | 15.0 | 25.0 |

Calibrators concentration is lot-specific; the exact values are stated on labels and Certificate of Analysis for each lot. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

6.2. Preparation of diluted Conjugate

Dilute the Conjugate 1:11 with Conjugate Buffer in a suitable container. For example, dilute 160 µL of conjugate in 1.6 mL of conjugate buffer. This reagent should be used within 24 hours for maximum performance of the assay. Store at 2-8°C.

IMPORTANT NOTE: prolonged exposure of the Conjugate to sunlight may affect the functional characteristics of the assay; therefore do not expose Conjugate (and diluted Conjugate) to direct sunlight.

6.3. Preparation of Wash Solution

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

6.4. Preparation of the Sample

The determination of T4 should be performed in human serum or plasma.

Specimens may be refrigerated at 2-8°C (for a maximum period of 48 hours). If the sample cannot be assayed within 48 hours, it may be stored at -20°C up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. When assayed in duplicate, 0.050 mL of the specimen is required.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

| | | | |
|---|--------|--------|--------|
| Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C). | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes. | | | |

7. QUALITY CONTROL

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

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for T4 ELISA.

| | Mean (µg/dL) | SD | Range (µg/dL) |
|----------------------|--------------|-----|---------------|
| Normal Values | 7,6 | 1,6 | 4,4 - 10,8 |

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should

| Reagent | Calibrator | Sample/Control | Blank |
|---|------------|----------------|--------|
| Sample/Control | | 25 µL | |
| Calibrator C ₀ -C ₅ | 25 µL | | |
| Diluted Conjugate | 100 µL | 100 µL | |
| Incubate 1 h at room temperature (22÷28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times. | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL |

consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 8.16\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is $\leq 8.42\%$.

10.2. Accuracy

The recovery of 1.25 - 2.50 - 5.00 - 10.00 $\mu\text{g/dL}$ of T4 added to sample gave an average value ($\pm\text{SD}$) of $97.8\% \pm 5\%$ with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of T4 that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.4 $\mu\text{g/dL}$ at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

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

| Substance | Cross Reactivity | Concentration |
|---------------------------|------------------|----------------------|
| I-Thyroxine | 1.0000 | - |
| d-Thyroxine | 0.9800 | 10 $\mu\text{g/dL}$ |
| I-Triiodo-thyronine | 0.0300 | 100 $\mu\text{g/dL}$ |
| d-Triiodo-thyronine | 0.0150 | 100 $\mu\text{g/dL}$ |
| Monoiodo-Tyrosine | N/D | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| Diiiodo-Tyrosine | N/D | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| Triiodothyroacetic Acid | N/D | 100 $\mu\text{g/mL}$ |
| Tetraiodothyroacetic Acid | 0.0001 | 100 $\mu\text{g/mL}$ |

10.5. Correlation with RIA

Diametra T4 ELISA was compared to another commercially available T4 assay. 114 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$(T4 \text{ Diametra}) = 0.959 \cdot (T4 \text{ RIA}) + 0.339$$

$$r^2 = 0.936$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine" *Journal Biological Chemistry*, **173**, 175 (1948).
2. Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine," *J.Clinical Endocrinol*, **33**, 865 (1971).
3. Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on clinical Laboratory Tests." *Clinical Chemistry*, **21**, 3660 (1975).
4. Sterling, L., *Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease*, Cleveland CRC press, P.19-51 (1975).

Ed. 01/2015

DCM045-10

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM045-10
Ed. 01/2015

T4 ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la tiroxina (T4) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO045

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de tiroxina (T4) en suero o plasma humano.

El kit T4 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hormona tiroidea, tiroxina (T4), es producida por la glándula tiroides. El yodo es un componente importante en la síntesis. La forma mayormente presente en la sangre de las hormonas tiroideas es la tiroxina (T4). La tiroxina se convierte en T3 activa (tres-cuatro veces más potente que la T4) dentro de las células por la deiodinasa (5'-iodinasa).

La globulina que transporta la tiroxina (TGB) es la proteína transportadora de la hormona tiroidea circulante. Solo una fracción muy pequeña de la hormona está libre - T4 0,03%.

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

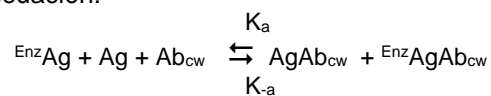
Las hormonas tiroideas actúan mediante un mecanismo desconocido para inhibir la actividad neuronal; uno de los efectos es la disminución de la temperatura corporal.

Tanto la T3 como la T4 se emplean en el tratamiento de la carencia de hormonas tiroideas (hipotiroidismo). La medición de las concentraciones totales de T3 en suero es un estándar y una prueba validada de la función tiroidea.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La tiroxina (T4, antígeno) presente en la muestra compite con la T4 antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-T4 absorbido en la microplaca (fase sólida) (el conjugado no debe tener enlaces medibles con las proteínas del suero, especialmente TBG y albúmina).

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



Ab_{cw}: anticuerpo monoespecífico inmovilizado (cantidad constante)

Ag: antígeno nativo (cantidad variable)

EnzAg: antígeno conjugado con enzima HRP (cantidad constante)

Ag Ab_{cw}: complejo antígeno-anticuerpo

Enz Ag Ab_{cw}: complejo antígeno-HRP-anticuerpo

K_a: constante de asociación

K_{-a}: constante de disociación

K = k_a / k_{-a}: constante de equilibrio

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

Por último, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el Substrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de T4 presente en la muestra.

La concentración de T4 en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

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

CAL0 REF DCE002/4506-0

CAL1 REF DCE002/4507-0

CAL2 REF DCE002/4508-0

CAL3 REF DCE002/4509-0

CAL4 REF DCE002/4510-0

CAL5 REF DCE002/4511-0

2. Tampón de conjugado (1 frasco, 12,5 mL)

Tampón con conservantes e inhibidores de las proteínas de unión REF DCE002/4501-0

3. Conjugado (1 frasco, 1,4 mL)

T4 conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

(Mantener alejado de la luz solar)

REF DCE002/4502-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)
Anticuerpo anti T4 absorbido en la microplaca
REF DCE002/4503-0
5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE004-0
6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE005-0
7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)
NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

Nota

Conservar los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz. Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de interrupción está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- La concentración de la tiroxina total en suero depende de múltiples factores: de la función de la glándula tiroides y de su regulación, de la globulina que transporta la tiroxina (TGB), y de la unión de la tiroxina a la TGB. Sin embargo, la concentración de tiroxina total no es suficiente por sí sola para controlar el estado clínico.

- Los valores de tiroxina total en suero pueden aumentar durante el embarazo o por el suministro de anticonceptivos orales. La revista de la Asociación americana de química clínica (*Journal of the American Association of Clinical Chemists*) ha recopilado una tabla de las drogas que interfieren y las condiciones en las que los valores de tiroxina total se ven afectados.
- No usar para la detección en neonatos

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcadas. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₅)

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

| | C ₀ | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| µg/dL | 0 | 2,0 | 5,0 | 10,0 | 15,0 | 25,0 |

Los niveles exactos se indican en las etiquetas para cada lote específico. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

6.2. Preparación del conjugado diluido

Diluir el Conjugado 1:11 con el Tampón de Conjugado. Por ejemplo, diluir 160 µL en 1,6 mL de tampón de conjugado. Utilizar en 24 horas. Mantener a una temperatura de 2-8°C.

NOTA IMPORTANTE: la exposición prolongada del Conjugado a la luz solar puede afectar las características funcionales de la prueba, por lo tanto no exponga el Conjugado (y el Conjugado diluido) a la luz solar directa.

6.3. Preparación de la solución de lavado

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

6.4. Preparación de la muestra

La determinación de T4 se realiza en suero o plasma humano. Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C (durante un período máximo de 48 horas). Si no se va a comprobar en un plazo de 48 horas, puede conservarse a -20°C hasta 30 días. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras. Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,050 mL de la muestra.

6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

| Reactivo | Calibrador | Muestra/Control | Blanco |
|---|------------|-----------------|--------|
| Muestra/Control | | 25 µL | |
| Calibrador C ₀ -C ₅ | 25 µL | | |
| Conjugado diluido | 100 µL | 100 µL | |
| Incubar 1 hora a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces. | | | |
| Substrato TMB | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22±28°C), protegida de la luz. | | | |
| Solución de parada | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos. | | | |

7. CONTROL DE CALIDAD

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

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

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C₀-C₅) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en µg/dL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Se ha utilizado un estudio de población adulta eutiroidea para determinar los valores esperados para el kit T4 ELISA.

| | Media (µg/dL) | SD | Rango (µg/dL) |
|------------------|---------------|-----|---------------|
| Valores normales | 7,6 | 1,6 | 4,4 - 10,8 |

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

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres controles distintos. La variabilidad intraensayo es ≤ 8,16%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres controles distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es ≤ 8,42%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 1,25 - 2,50 - 5,00 - 10,00 µg/dL de T4 ha dado un valor medio (±SD) de 97,8% ± 5%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de T4 medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,4 µg/dL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

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

| Sustancia | Reactividad cruzada | Concentración |
|----------------------------|---------------------|---------------|
| I-tiroxina | 1,0000 | - |
| d-tiroxina | 0,9800 | 10 µg/dL |
| I-triyodo-tironina | 0,0300 | 100 µg/dL |
| d-triyodo-tironina | 0,0150 | 100 µg/dL |
| Monoyodo-tirosina | N/D | 100 µg/mL |
| Diyodo-tirosina | N/D | 100 µg/mL |
| Ácido triyodotiroacético | N/D | 100 µg/mL |
| Ácido tetrayodotiroacético | 0,0001 | 100 µg/mL |

10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit Diametra T4 ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 114 muestras de suero. La curva de regresión es:
(T4 Diametra) = 0,959*(T4 RIA) + 0,339
r² = 0,936

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

- Barker, S.B., "Determination of Protein Bound Iodine" Journal Biological Chemistry, 173, 175 (1948).
- Chopra, I.J., Solomon, D.H., and Ho, R.S., "A Radioimmunoassay of Thyroxine," J.Clinical Endocrinol, 33, 865 (1971).
- Young, D.S., Pestaner, L.C., and Gilberman, U., "Effects of Drugs on clinical Laboratory Tests." Clinical Chemistry, 21, 3660 (1975).
- Sterling, L., Diagnosis and Treatment of Thyroid Disease, Cleveland CRC press, P.19-51 (1975).

Ed. 01/2015

DCM045-10

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

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

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

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

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

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

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

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

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

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

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

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

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

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

Valores inexplicablemente fuera de escala

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

CV% intraensayo elevado

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

CV% interensayo elevado

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

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

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

Réaction trop faible (DO trop basse)

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

Réaction trop intense (DO trop élevée)

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

Valeurs inexplicablement hors plage

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

CV% intra-essai élevé

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

CV% inter-essai élevé

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