



## Instructions for Use

# Free Triiodothyronine (FT3) ELISA

*Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of Free Triiodothyronine (fT3) in human serum*



EIA-2385



96



**DRG** 

DRG Instruments GmbH, Germany  
Frauenbergstraße, 18, D-35039 Marburg  
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50  
Website: [www.drg-diagnostics.de](http://www.drg-diagnostics.de)  
E-mail: [drg@drg-diagnostics.de](mailto:drg@drg-diagnostics.de)

Distributed by:

**DRG** 

DRG International, Inc., USA  
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081  
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556  
Website: [www.drg-international.com](http://www.drg-international.com)  
E-mail: [corp@drg-international.com](mailto:corp@drg-international.com)

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.  
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.  
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.  
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

**Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos**

1	INTENDED USE .....	3
2	INTRODUCTION.....	3
3	PRINCIPLE OF THE TEST.....	3
4	REAGENTS .....	3
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	4
6	STORAGE OF TEST KIT AND INSTRUMENTATION .....	4
7	REAGENT PREPARATION .....	4
8	ASSAY PROCEDURE .....	4
9	CALCULATION OF RESULTS .....	5
10	PERFORMANCE CHARACTERISTICS .....	5
11	EXPECTED VALUES .....	6
12	CLINICAL SIGNIFICANCE .....	6
13	LIMITATIONS OF THE PROCEDURE .....	7
14	REFERENCES/LITERATURE .....	7
1	VERWENDUNGSZWECK .....	8
2	TESTPRINZIP.....	8
3	REAGENZIEN.....	8
4	PROBEN .....	8
5	AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN.....	8
6	VORBEREITUNG DER REAGENZIEN .....	9
7	TESTDURCHFÜHRUNG.....	9
8	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE .....	9
9	TEST-CHARAKTERISITKA .....	10
10	ERWARTETE WERTE .....	10
11	GRENZEN DES TESTS .....	10
1	INTRODUZIONE.....	11
2	PRINCIPIO DEL TEST .....	11
3	REAGENTI.....	11
4	COLLEZIONE DEI CAMPIONI .....	12
5	MAGAZZINAGGIO DEI REAGENTI .....	12
6	PREPARAZIONE DEI REAGENTI .....	12
7	ATTUAZIONE DEL TEST .....	12
8	CALCOLO DEI RISULTATI .....	12
9	CARATTERISTICHE DEL TEST .....	13
10	VALORI NORMALI .....	13
11	LIMITAZIONE DEL TEST .....	13

1	USO PREVISTO .....	14
2	INTRODUCCIÓN .....	14
3	PRINCIPIO DE LA PRUEBA .....	14
4	REACTIVOS .....	14
5	RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS .....	15
6	ALMACENAMIENTO DEL KIT Y EL INSTRUMENTAL DE LA PRUEBA .....	15
7	PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	15
8	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO.....	16
9	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS .....	16
10	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO .....	17
11	VALORES ESPERADOS.....	18
12	SIGNIFICADO CLÍNICO .....	18
13	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO .....	18
SYMBOLS USED .....		19

**For In Vitro Diagnostic Use Only**

Store at 2 °C to 8 °C.

**1 INTENDED USE**

For the quantitative determination of Free Triiodothyronine (fT3) concentration in human Serum.

**2 INTRODUCTION**

L-Triiodothyronine, a thyroid hormone, circulates in blood almost completely bound (>99.5%) to carrier proteins. The main transport protein is thyroxine-binding globulin (TBG). However, only the free (unbound) portion of triiodothyronine is believed to be responsible for the biological action. Furthermore, the concentrations of the carrier proteins are altered in many clinical conditions, such as pregnancy. In individuals with normal thyroid function, as the concentrations of the carrier proteins change, the total T3 levels change in consequence so that the free triiodothyronine (fT3) concentration remains constant. Thus, measurements of fT3 concentrations correlate more reliably with clinical status than total triiodothyronine levels.

For example, the increase in total triiodothyronine levels associated with pregnancy, oral contraceptives, and estrogen therapy result in higher total T3 levels while the fT3 concentration remains basically unchanged.

This microplate enzyme immunoassay methodology provides the technician with optimum sensitivity while requiring few technical manipulations in a direct determination of fT3

**3 PRINCIPLE OF THE TEST**

The fT3 test is a solid phase competitive enzyme immunoassay. Patient serum samples, standards, and T3-Enzyme Conjugate Working Reagent is added to wells coated with monoclonal T3 antibody. fT3 in the patient specimen and the T3 labeled conjugate compete for available binding sites on the antibody. After a 60 minutes incubation at room temperature, the wells are washed with water to remove unbound T3 conjugate. A solution of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB is then added and incubated for 20 minutes, resulting in the development of blue color. The color development is stopped with the addition of 3N HCl, and the absorbance is measured spectrophotometrically at 450 nm. The intensity of the color formed is proportional to the amount of enzyme present and is inversely related to the amount of unlabeled fT3 in the sample. By reference to a series of fT3 standards assayed in the same way, the concentration of fT3 in the unknown sample is quantified.

**4 REAGENTS****4.1 Materials provided with the kit**

- **AntibodyCoated Microplate** (1 plate, 96 wells)  
Microtiter wells coated with Anti-T3
- **fT3-Enzyme Conjugate** Reagent, ready to use (1 vial, 10.5 mL)  
Contains T3 Ab conjugated to horseradish peroxidase with preservatives
- **Free T3 Reference Standard Set** (1.0 mL/vial)  
Contains 0 - 0.9 - 2.2 - 5.0 - 9.0 - 19.0 pg/mL of fT3 in human serum with preservatives; liquid, ready to use  
*\* Exact levels are given on the labels on a lot specific basis!*
- **Color Reagent A**, (1 bottle, 13 mL)  
Contains hydrogen peroxide in acetate buffer
- **Color Reagent B** (1 bottle, 13 mL)  
Contains 3, 3', 5, 5' tetramethylbenzidine (TMB) stabilized in buffer solution.
- **Stop Solution** (3N HCl) (1 bottle, 10 mL)  
Contains diluted hydrochloric acid

#### 4.2 Materials required but not provided:

- Pipette capable of delivering 50 µL volumes with a precision of better than 1.5%.
- Dispenser(s) for repetitive deliveries of 0.050 mL and 0.200 mL volumes with a precision of better than 1.5%.
- Microplate Reader with 450 nm wavelength absorbance capability.
- Test tubes for dilution of enzyme conjugate and for mixing Color Reagent A with Color Reagent B.
- Absorbent paper of blotting the microplate wells.
- Timer.
- Quality control materials.

### 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum should be prepared from a whole blood specimen obtained by acceptable medical techniques.

This kit is for use with serum sample without additives only.

Serum samples may be refrigerated at 2 °C - 8 °C for a maximum period of 48 hours. If the samples cannot be assayed within 48 hours, they may be stored at temperatures of -20 °C for up to 30 days.

### 6 STORAGE OF TEST KIT AND INSTRUMENTATION

Unopened test kits should be stored at 2 °C - 8 °C upon receipt and the microtiter plate should be kept in a sealed bag with desiccants to minimize exposure to damp air.

Opened test kits will remain stable until the expiration date shown, provided it is stored as described above.

A microtiter plate reader with a bandwidth of 10 nm or less and an optical density range of 0 - 2 OD or greater at 450 nm wavelength is acceptable for use in absorbance measurement.

### 7 REAGENT PREPARATION

#### Working Substrate Solution – Prepare immediately before use.

To prepare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB solution, make a 1:1 mixing of Color Reagent A with Color reagent B up to 1 hour before use. Mix gently to ensure complete mixing.

The prepared H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB reagent should be made at least 15 minutes before use and is stable at room temperature in the dark for up to 3 hours. Discard excess after use.

### 8 ASSAY PROCEDURE

Before proceeding with the assay, bring all reagents, serum references and controls to room temperature (18 °C - 25 °C).

1. Format the microplates' wells for each serum reference, control, and patient specimen to be assayed in duplicate.
2. Pipette 0.050 mL (50 µL) of the appropriate serum reference, control, and specimen into the assigned well.
3. Add 0.100 mL (100 µL) of T3-Enzyme Conjugate Solution to all wells.
4. Swirl the microplate gently for 20-30 seconds to mix and cover.
5. Incubate 60 minutes at room temperature.
6. Remove the incubation mixture by emptying the plate content into a waste container. Rinse and empty the microtiter plate 5 times with distilled water. Strike the microtiter plate sharply onto absorbent paper or paper towels to remove all residual water droplets.
7. Add 0.200 mL (200 µL) of **Working Substrate Solution** to all wells (see Reagent Preparation Section). **Always add reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells.** Gently mix for 10 seconds.
8. Incubate at room temperature in the dark for 20 minutes.
9. Stop the reaction by adding 50 µL of 3N HCl to each well.
10. Gently mix for 30 seconds. **It is important to make sure that all the blue color changes to yellow color completely.**
11. Read absorbance at 450 nm with a microtiter well reader within 30 minutes.

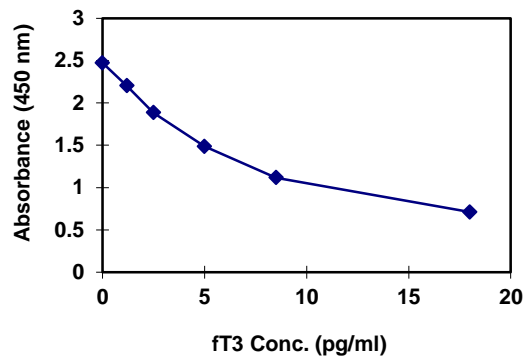
**9 CALCULATION OF RESULTS**

1. Calculate the mean absorbance value ( $A_{450}$ ) for each set of reference standards, controls and patient samples.
2. Construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained for each reference standard against its concentration in pg/mL on graph paper, with absorbance values on the vertical or Y axis, and concentrations on the horizontal or X axis.
3. Use the mean absorbance values for each specimen to determine the corresponding concentration of fT3 in pg/mL from the standard curve.

**9.1 Example of Standard Curve**

Results of a typical standard run with optical density readings at 450 nm shown in the Y axis against fT3 concentrations shown in the X axis. This standard curve is for the purpose of illustration only, and should not be used to calculate unknowns. Each user should obtain his or her own data and standard curve in each experiment.

fT3 (pg/mL)	Absorbance (450 nm)
0	2.474
1.2	2.202
2.5	1.884
5.0	1.485
8.5	1.117
18.0	0.710



**10 PERFORMANCE CHARACTERISTICS**

**10.1 Accuracy**

The fT3 Microplate EIA Test System was compared with a coated tube radioimmunoassay method. Biological specimens from hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid populations were used (Values ranged from 0.1 pg/mL – 14 pg/mL). The total number of such specimens was 151.

The least square regression equation and the correlation coefficient were computed for this fT3 EIA Test System in comparison with the reference method. The data obtained is shown in the following table:

Method	Mean (X)	Least Square Regression Analysis	Coefficient
This method	3.045	$y = 0.978(x) - 0.116$	0.950
Reference	2.921		

Only slight amounts of bias between this method and the reference method are indicated by the closeness of the mean values. The least square regression equation and correlation coefficient indicates excellent method agreement.

**10.2 Precision**

The within and between assay precision of the fT3 Microplate EIA Test System were determined by analyses on three different levels of pool control sera. The number, mean values, standard deviation and coefficient of variation for each of these control sera are shown in the following tables:

**Within Assay Precision (Values in pg/mL)**

Sample	N	X	S.D.	C.V %.
Low	24	1.85	0.09	4.9
Normal	24	4.49	0.16	3.6
High	24	8.0	0.25	3.1

**Between Assay Precision (Values in pg/mL)\***

Sample	N	X	S.D.	C.V. %
Low	12	2.16	0.29	13.1
Normal	12	5.09	0.40	7.9
High	12	9.13	0.94	10.2

\*As measured in ten experiments in duplicate over a ten day period.

**10.3 Specificity**

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

Substance	Cross Reactivity	Concentration
I-Triiodothyronine	1.0000	-
I-Thyroxine	< 0.0002	10 µg/mL
Iodothyrosine	< 0.0001	10 µg/mL
Diiodothyrosine	< 0.0001	10 µg/mL
Phenylbutzone	< 0.0001	10 µg/mL
Sodium Salicylate	< 0.0001	10 µg/mL

**10.4 Sensitivity**

The ft3 EIA procedure has a sensitivity of 0.05 pg/mL. The sensitivity was ascertained by determining the variability of the 0 pg/mL serum calibrator and using the  $2\sigma$  (95% certainty) statistic to calculate the minimum dose.

**11 EXPECTED VALUES**

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for the ft3 EIA Test System. The mean (X) values, standard deviations ( $\sigma$ ) and expected ranges ( $\pm 2\sigma$ ) are presented in the following table:

**Expected Values for the Free T3 ELISA (in pg/mL)**

	Adult (110 specimens)	Pregnancy (75 specimens)
Mean (X)	2.8	3.0
Standard Deviation ( $\sigma$ )	0.7	0.6
Expected Ranges ( $\pm 2\sigma$ )	1.4 - 4.2	1.8 - 4.2

It is important to keep in mind that establishment of a range of values which can be expected to be found by a given method for a population of "normal" persons is dependent upon several factors: the specificity of the method, the population tested, and the precision of the method in the hands of the analyst. For these reasons each laboratory should depend upon the range of expected values established by the Manufacturer only until an in-house range can be determined by the analysts using the method with a population indigenous to the area in which the laboratory is located.

**12 CLINICAL SIGNIFICANCE**

Alterations in the concentration of serum binding proteins will generally result in a corresponding change in total T3 concentrations while the physiologically active ft3 level remains largely unchanged in an euthyroid individual. Therefore, determination of ft3 concentration may provide a more accurate assessment of thyroid status than total T3 measurement. Elevated ft3 Concentrations are indicative of hyperthyroidism and low levels are indicative of hypothyroidism.

**13 LIMITATIONS OF THE PROCEDURE**

1. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out with a complete understanding of the package insert instructions and with adherence to good laboratory practice.
2. The wash procedure is critical. Insufficient washing will result in poor precision and falsely elevated absorbance readings.
3. Serum samples demonstrating gross lipemia, gross hemolysis, or turbidity should not be used with this test.
4. The results obtained from the use of this kit should be used only as an adjunct to other diagnostic procedures and information available to the physician.

**14 REFERENCES/LITERATURE**

1. Tietz, N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, 2<sup>nd</sup> Ed., pg. 602, Saunders Press, Phila., 1976.
2. Horworth, P.J.N., Ward, R.L., J. Clin Pathol. 1972; 25:259-62.
3. Sati, C., Chatter, A.J., Watts, N. Fundamentals of Clinical Chemistry. Ed. Tietz, N.W. 3<sup>rd</sup> Ed., pg. 586. Saunders press Phila. 1987.
4. Lundberg, P.A., Jagenburg, R., Lindstedt, G., Nystrom, E., Clin. Chem. 1982, 28:1241.
5. Melmed, S., Geola, F.L., Reed, A.W., Pekary, A.E., Park, J., Hershmen, J. M., Clin Endocrin. Metabol. 1982, 54;300.
6. Ingbar, S.H., et al. J. Clin. Invest., 1965, 44:1679.
7. Selenkow, H.A., and Robin, N.I., J. Maine Med. Assoc. 1970, 61:199.
8. Oppenheimer, J.H., et al. J. Clin. Invest. 1962, 42: 1769.
9. Dick, M., Watson, F., Med J. Aust. 1980, 1:115.
10. Dussault, j. H., Turcotte, R., and Gieyda, H., Clin Endocrin. Metabol. 1976, 43: 232-285.
11. Tarnoky, A.L. Advan. Clin. Chem. 1981, 21:101-146.
12. Emrich, D., Schondube, H.,- Sehlen, S., and Schreivagel, I., Nuc. Compact, 1985, 16:392.
13. Procedures for Decontamination of Plumbing Systems Containing Copper and/or Lead azides, Dept. of H.E.W., N.I.O.S.H., Rockville, Maryland, 1976.



## 1 VERWENDUNGSZWECK

Enzymimmunoassay für die quantitative Bestimmung von Freier Triiodothyronin Konzentration in humanem Serum.

## 2 TESTPRINZIP

Der FT3 ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert.

## 3 REAGENZIEN

### 3.1 Im Kit enthalten

1. **Coated Microplate:** beschichtete Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen
2. **Enzyme Conjugate:** 1 Fläschchen mit T3-Enzymkonjugat, 10,5 mL. Gebrauchsfertig
3. **Standards:** 6 Fläschchen  
1.0 mL/Fläschchen, gebrauchsfertig.  
Die lot-abhängigen Konzentrationen stehen auf dem Fläschchenetikett.
4. **Color Reagent A:** Eine Flasche Substrat A. 13 mL
5. **Color Reagent B:** Eine Flasche Substrat B. 13 mL
6. **Stop Solution:** Eine Flasche Stopplösung, (3N HCl). 10 mL

### 3.2 Benötigte Materialien die nicht im Kit enthalten sind:

- Präzisions-Pipetten: 50 µL, 20 µL - 200 µL und 200 µL - 1.0 mL; Einmal Pipettenspitzen
- Microtiter Platten Lesegerät (450nm Wellenlänge)
- Destilliertes Wasser
- Gefäße zum Mischen der Substratlösung A und B
- Saugpapier oder Papierhandtuch
- Laborwecker
- Qualitätskontrollmaterial

## 4 PROBEN

Blut durch Venenpunktion entnehmen, gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Für diesen Test sollten nur Serumproben ohne Zusätze verwendet werden.

Serumproben können bei 2 °C - 8 °C für maximal 48 Stunden gelagert werden. Tiefgefroren bei -20 °C ist eine Lagerung für bis zu 30 Tagen möglich.

## 5 AUFBEWAHRUNG DER REAGENZIEN

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C - 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C - 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C - 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits ihre Reaktivität bis zum angegebenen Verfallsdatum

## 6 VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

Herstellung der **gebrauchsfertigen Substratlösung**:

Mischen Sie zu gleichen Teilen Substrat A und Substrat B bis zu 60 Minuten vor der Durchführung des Assays. Z.B. für ein 8-Well Streifen benötigen Sie 1 mL Substrat A und 1 mL Substrat B. Mischen Sie die Lösung gründlich. Die gebrauchsfertige Lösung ist im Dunkeln bei Raumtemperatur 3 Stunden haltbar. Verwerfen Sie evtl. anfallende Reste.

## 7 TESTDURCHFÜHRUNG

*Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.*

1. Die benötigte Anzahl an Wells in der Halterung befestigen.
2. 50 µL Standards, Kontrollen und Proben in die entsprechenden Vertiefungen pipettieren.
3. 100 µL gebrauchsfertiges Enzymkonjugat in alle Vertiefungen geben.
4. Ca. 20-30 Sek. gründlich mischen. **Eine vollständige Vermischung der Reagenzien ist sehr wichtig!**
5. 60 Min. bei Raumtemperatur (18 °C - 25 °C) inkubieren.
6. Inkubationslösung zügig abschütten. Vertiefungen 5-mal mit Aqua dest, ca. 300 µL pro Well, waschen. Nach dem letzten Waschen Wassertropfen aus den Vertiefungen durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen. (Bitte kein Leitungswasser verwenden!)
7. 200 µL Substratlösung in alle Vertiefungen geben. (Siehe Kap.6) Vorsichtig für 10 Sekunden mischen.
8. 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Die Reaktion durch Zugabe von 50 µL Stopplösung stoppen.
10. 30 Sek. vorsichtig mischen. **Es ist wichtig, dass der Farbumschlag von Blau zu Gelb vollständig erfolgt.**
11. Die Extinktion bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 30 Min. bestimmen.

## 8 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE.

Die FT3-Konzentration der Proben wird wie folgt berechnet:

Eine Standardkurve wird erstellt, indem man die durchschnittliche Extinktion (y) der Referenzstandards gegen die entsprechende Konzentration in pg/mL (x) auf linearem Millimeterpapier aufträgt.

Die FT3-Konzentration der Patientenprobe kann nun durch Interpolation aus dieser Standardkurve ermittelt werden. Falls vorhanden, kann die Berechnung der Daten mit entsprechender Software per Computer erfolgen.

### 8.1 Beispielhafte Standardkurve

Die folgenden Daten dienen ausschließlich zur Demonstration und können keinesfalls zur Auswertung von Testergebnissen verwendet werden.

FT3 (pg/mL)	Absorbance (450 nm)
0	2,474
1,2	2,202
2,5	1,884
5,0	1,485
8,5	1,117
18,0	0,710

## 9 TEST-CHARAKTERISITKA

### Sensitivität

Die kleinste mit dem FT3 ELISA nachweisbare F T3-Konzentration beträgt 0,05 pg/mL.

Weitere Daten entnehmen sie bitte der ausführlichen englischen Anleitung.

## 10 ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

	<b>Erwachsene (pg/mL)</b>	<b>Schwangere (pg/mL)</b>
Mittelwert (X)	2,8	3,0
Standard Abweichung (S.D.)	0,7	0,6
Erwarteter Bereich ( $\pm 2$ S.D.)	1,4 - 4,2	1,8 - 4,2

## 11 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

1. Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten.
2. Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
3. Lipämische, ikterische und/oder stark hämolysierte Proben sollten nicht verwendet werden.
4. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

## 1 INTRODUZIONE

### 1.1 Applicabilità

Per la determinazione quantitativa di triiodotironina (fT3) nel siero umano.

### 1.2 Introduzione

Triiodotironina, un ormone tiroidale, circola nel sangue quasi completamente (>99.5%) legato a proteine trasportatori (1,2). La più importante proteina tra queste è la globulina tiroxina-legante (TBG). Soltanto la parte non legata (libera) della triiodotironina sembra essere biologicamente attiva. Inoltre, le concentrazioni delle proteine trasportatrici possono variare a seconda della condizione clinica del paziente, per esempio durante la gravidanza. In uno stato di normale funzionalità tiroidale la concentrazione totale della triiodotironina rimane costante, anche se la concentrazione delle proteine carrier varia. Perciò la determinazione della triiodotironina libera rispecchia più accuratamente lo stato clinico.

Per esempio, l'aumento dei livelli della triiodotironina totale legato alla gravidanza o alla terapia contraccettiva orale o di estrogeni porta a valori alzati della T3 totale, mentre la concentrazione della T3 libera rimane praticamente inalterata.

La metodologia a base di un immunoassay enzimatico su micropiastre garantisce una diretta determinazione di T3 libera con un'ottima sensibilità e un minimo a manipolazioni tecniche da parte dell'operatore.

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il fT3 test è un immunoassay enzimatico competitivo in fase solida. Campioni di siero, standard e il coniugato enzimatico T-3 sono mescolati in pozzetti ricoperti con l'anticorpo monoclonale T3. fT3 nel siero dei pazienti e il coniugato competono per i siti di legame dell'anticorpo. Dopo 60 minuti di incubazione a temperatura ambiente i pozzetti sono lavati con acqua per rimuovere il coniugato T3 non legato. Una soluzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> /TMB (benzidine tetrametilico) viene aggiunto e incubato per 20 minuti. Il risultato è lo sviluppo di un colore blu. La reazione è fermata dall'aggiunta di 3 N HCL e l'assorbanza è misurata spettrofotometricamente a 450 nm. L'intensità del colore è direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima presente e inversamente correlata alla quantità di fT3 libero nel campione. Tramite una serie di fT3 standard testati insieme ai campioni, la concentrazione ignota di fT3 nei campioni può essere calcolata.

## 3 REAGENTI

### 3.1 Materiali contenuti nel kit:

1. **Coated Microplate:** Micropozzetti a 96 pozzetti ricoperti con anticorpi
2. **Enzyme Conjugate:** Un (1) flacone con coniugato enzimatico T3; 10.5 mL, pronto all'uso
3. **Standard:** Sei (6) flaconi con standards di triiodotironina, 1.0 mL / flacone, pronto all'uso  
I valori sono indicati sull'etichetta dei flaconi.
4. **Color Reagent A:** Un (1) flacone di substrato A, 13 mL
5. **Color Reagent B:** Un (1) flacone di substrato B, 13 mL
6. **Stop Solution:** Un (1) flacone di soluzione d'arresto, 3 N HCl, 10 mL

### 3.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit:

- Pipette a precisione: 50 µL, 20 µL - 200 µL und 200 µL - 1.0 mL
- Spettrofotometro per micropozzetti (450 nm lunghezza d'onda)
- Sciacquatore per micropozzetti
- Acqua distillata
- Contenitori per mescolare le soluzioni substrato A e B.
- Agitatore vortex
- Materiale per il controllo qualità

#### 4 COLLEZIONE DEI CAMPIONI

Prelevare il sangue tramite puntura venale, lasciare coagulare e separare il siero centrifugando il campione a temperatura ambiente. Per questo test dovrebbero essere utilizzati sieri senza aggiunte.

Campioni di sieri possono essere magazzinati per 48 ore a 2 °C - 8 °C. Per un magazzinaggio fino a 30 giorni i campioni dovrebbero essere congelati a -20 °C.

#### 5 MAGAZZINAGGIO DEI REAGENTI

Test kits non aperti dovrebbero essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. La data di scadenza è indicata sull'etichetta del kit.

A 2-8°C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C - 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

#### 6 PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Preparazione della **soluzione substrato**:

Mescolare parti uguali di substrato A e substrato B fino a 15 minuti prima dell'attuazione del test. Per una colonna di 8 pozzetti si necessitano 1 mL di substrato A e 1 mL di substrato B. Mescolare accuratamente la soluzione. La soluzione pronta all'uso si mantiene per 3 ore al buio. Soluzioni avanzate devono essere eliminate.

#### 7 ATTUAZIONE DEL TEST

*Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso.*

1. Posizionare il numero necessario di pozzetti nell'apposito supporto.
2. Pipettare 50 µL degli standard, dei controlli e dei campioni in ciascun pozzetto.
3. Aggiungere 100 µL coniugato enzimatico pronto all'uso in ogni pozzetto.
4. Mescolare agitando per 20-30 secondi. **Un completo mescolamento dei reagenti è molto importante!**
5. Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (18 °C - 25 °C).
6. Vuotare i pozzetti capovolgendoli. Lavare i pozzetti 5 volte con acqua distillata, ca 300 µL per pozzetto. Dopo l'ultimo lavaggio rimuovere le rimanenti gocce d'acqua scuotendo i pozzetti contro la carta assorbente. (non utilizzare acqua del rubinetto!)
7. Aggiungere 200 µL soluzione substrato in ogni pozzetto.
8. Coprire e incubare al buio a temperatura ambiente per 20 minuti.
9. Terminare la reazione con l'aggiunta di 50 µL della soluzione d'arresto.
10. Mescolare cautamente per 30 secondi. **È importante che il colore blu vira completamente al giallo.**
11. Determinare l'estinzione a 450 nm con un lettore di micropozzetti **entro 30 min.**

#### 8 CALCOLO DEI RISULTATI

La concentrazione di fT3 viene calcolata come segue:

Si costruisce una curva standard con le medie della estinzione in ordinata (y) degli standard e delle rispettive concentrazioni in pg/mL sull'ascisse (x).

La concentrazione di fT3 dei campioni può essere determinata per interpolazione con la curva standard. Il calcolo può essere eseguito anche al calcolatore.

### 8.1 Curva standard esemplare

I seguenti dati servono esclusivamente per la dimostrazione e non possono essere utilizzati in alcun caso per l'analisi dei risultati.

FT3 (pg/mL)	Assorbanza (450 nm)
0	2,474
1,2	2,202
2,5	1,884
5,0	1,485
8,5	1,117
18,0	0,710

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### Sensitività

La concentrazione minima rilevabile con il test FT3 ELISA è 0,05 pg/mL.

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

## 10 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

	adulti (pg/mL)	Donne gravide (pg/mL)
Valori medi (X)	2,8	3,0
Deviazione standard (S.D.)	0,7	0,6
Deviazione st. allargata ( $\pm 2$ S.D.)	1,4 - 4,2	1,8 - 4,2

## 11 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

1. Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali.
2. Il lavaggio è un passaggio critico. Lavaggio insufficiente o la mancata rimozione d'acqua dopo i lavaggi porta a una precisione minore e a estinzioni falsamente alti.
3. Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.
4. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

---

**Uso exclusivo para diagnóstico in vitro**

Conservar entre 2 °C y 8 °C.

**1 USO PREVISTO**

Determinación cuantitativa de la concentración de triyodotironina libre (fT3) en suero humano.

**2 INTRODUCCIÓN**

La L-triyodotironina, una hormona tiroidea, circula en la sangre fijada prácticamente en su totalidad (>99,5%) a las proteínas transportadoras. La principal proteína de transporte es la globulina fijadora de tiroxina (TBG). Sin embargo, se cree que únicamente la fracción libre (no fijada) de la triyodotironina es la responsable de la acción biológica. Además, las concentraciones de las proteínas transportadoras se ven alteradas en diversas condiciones clínicas, como el embarazo. En las personas que presentan una función tiroidea normal, conforme las concentraciones de las proteínas transportadoras varían, los niveles totales de T3 cambian en consecuencia, de forma que la concentración de triyodotironina libre (fT3) se mantiene constante. De este modo, los análisis de las concentraciones de fT3 se relacionan de una forma más fiable con el estado clínico que los niveles totales de triyodotironina.

Por ejemplo, el aumento de los niveles totales de triyodotironina relacionados con el embarazo, los anticonceptivos orales y el tratamiento con estrógenos provocan unos niveles totales de T3 más elevados, mientras que la concentración de fT3 prácticamente permanece inalterada.

Esta metodología del inmunoensayo enzimático con microplaca ofrece al técnico una sensibilidad óptima y requiere pocas manipulaciones técnicas para la determinación directa de la fT3.

**3 PRINCIPIO DE LA PRUEBA**

La prueba de la fT3 constituye un inmunoensayo enzimático competitivo de fase sólida. Las muestras de suero de los pacientes, los estándares y el reactivo que actúa en el conjugado enzimático de T3 se añaden a los pocillos revestidos con anticuerpo monoclonal de T3. La fT3 de la muestra del paciente y el conjugado etiquetado de T3 compiten por los lugares de unión disponibles en el anticuerpo. Tras una incubación durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavan los pocillos con agua para eliminar el conjugado de T3 no fijado. A continuación se añade una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB y se incuba durante 20 minutos, lo que provoca que aparezca una coloración azul. La aparición de la coloración se detiene al añadir HCl 3N y se mide la absorbencia mediante espectrofotometría a 450 nm. La intensidad de la coloración desarrollada es proporcional a la cantidad de enzima presente y se relaciona inversamente con la cantidad de fT3 no identificada de la muestra. En relación con una serie de estándares de fT3 analizados del mismo modo, la concentración de fT3 en la muestra desconocida se cuantifica.

**4 REACTIVOS****4.1 Materiales suministrados con el kit**

- **Antibody Coated Microplate,**  
(Microplaca revestida de anticuerpos) (1 placa, 96 pocillos)  
Micropocillos revestidos con Anti-T3
- **Enzyme Conjugate,**  
Reactivo de conjugado enzimático de fT3, listo para su uso (1 vial, 10,5 mL)  
Contiene anticuerpos de T3 conjugados a peroxidasa de rábano con conservantes
- **Reference Standard Set,**  
Set de estándar de referencia de T3 libre (1.0 mL/vial)  
Contiene 0 - 0,9 - 2,2 - 5,0 - 9,0 - 19,0 pg/mL de fT3 en suero humano con conservantes; líquido, listo para su uso;  
*\* En las etiquetas se proporcionan los niveles exactos conforme al lote específico!*
- **Color Reagent A** (Reactivo de color A) (1 botella, 13 mL)  
Contiene peróxido de hidrógeno en solución tampón de acetato
- **Color Reagent B** (Reactivo de color B) (1 botella, 13 mL)  
Contiene 3, 3', 5, 5' tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada en solución tampón.
- Solución de parada (HCl 3N) (1 botella, 10 mL)  
Contiene ácido clorhídrico diluido

#### 4.2 Materiales necesarios pero no proporcionados:

- Pipeta capaz de distribuir volúmenes de 50 µL con una precisión superior al 1,5%.
- Dosificador(es) para suministrar de forma repetitiva volúmenes de 0,050 mL y 0,200 mL con una precisión superior al 1,5%.
- Lector de microplacas con una capacidad de absorbencia de longitud de onda de 450 nm.
- Tubos de prueba para la dilución del conjugado enzimático y para mezclar el Reactivo de color A con el Reactivo de color B.
- Papel absorbente para secar los pocillos de la microplaca.
- Cronómetro.
- Sueros de control para el control de calidad.

#### 5 RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El suero debe prepararse a partir de una muestra de sangre completa obtenida mediante técnicas médicas aceptables.

Este kit únicamente debe usarse con muestras de suero sin aditivos.

Las muestras de suero se pueden refrigerar a una temperatura entre 2 °C - 8 °C durante un tiempo máximo de 48 horas. Si las muestras no se pueden analizar en 48 horas, se podrán almacenar a una temperatura de -20 °C durante un periodo de hasta 30 días.

#### 6 ALMACENAMIENTO DEL KIT Y EL INSTRUMENTAL DE LA PRUEBA

Los kits de pruebas sin abrir pueden almacenarse a temperaturas de entre 2 °C - 8 °C tras recibirse y la placa de micropocillos se debe conservar en una bolsa sellada con desecantes para reducir la exposición al aire húmedo.

Los kits de pruebas abiertos permanecerán estables hasta la fecha de caducidad que se muestra, siempre y cuando se almacenen tal y como se ha descrito anteriormente.

Para la medición de la absorbencia, se aceptará un lector de placa de micropocillos con un ancho de banda de 10 nm o inferior y un rango de densidad óptica de 0 - 2,0 DO o superior con una longitud de onda de 450 nm.

#### 7 PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

**Solución de trabajo de sustrato: preparar inmediatamente antes de su uso.**

Para preparar una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB, realice una mezcla 1:1 del Reactivo de color A con el Reactivo de color B hasta 1 hora antes de su uso. Mezcle con cuidado para asegurar una mezcla homogénea.

La preparación del reactivo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/TMB debe realizarse como mínimo 15 minutos antes de su uso y es estable a temperatura ambiente en la oscuridad durante un periodo de hasta 3 horas. Deseche los excesos tras su uso.



## 8 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Antes de proceder con el ensayo, haga que todos los reactivos, referencias de suero y controles alcancen la temperatura ambiente (entre 18 °C - 25 °C).

1. Organice los pocillos de las microplacas para que cada referencia de suero, control y muestra del paciente se analicen por duplicado.
2. Pipetee 0,050 mL (50 µL) de la referencia de suero adecuada, del control y de la muestra en el pocillo asignado.
3. Añada 0,100 mL (100 µL) del reactivo del conjugado enzimático de T3 a todos los pocillos.
4. Gire suavemente la microplaca durante 20-30 segundos para que se mezcle y tápela.
5. Incube durante 60 minutos a temperatura ambiente.
6. Retire la mezcla de la incubación vaciando los contenidos de la placa en un contenedor de desechos. Aclare y vacíe la placa de micropocillos 5 veces con agua destilada. Golpee con fuerza la placa de micropocillos sobre un papel absorbente o toallitas de papel para eliminar todas las gotas de agua residuales.
7. Añada 0,200 mL (200 µL) de **solución de trabajo de sustrato** a todos los pocillos (consulte el apartado de Preparación de los reactivos). **Añada siempre los reactivos en el mismo orden para reducir las diferencias de tiempo de reacción entre los pocillos**. Mezcle con cuidado durante 10 segundos.
8. Incube a temperatura ambiente en la oscuridad durante 20 minutos.
9. Detenga la reacción añadiendo 0,050 mL (50 µL) de HCl 3N (solución de parada) a cada pocillo.
10. Mezcle con cuidado durante 30 segundos. **Es importante asegurarse de que toda la coloración azul cambia por completo a amarillo**.
11. Lea la absorbencia a 450 nm con un lector de micropocillos en un plazo de 30 minutos.

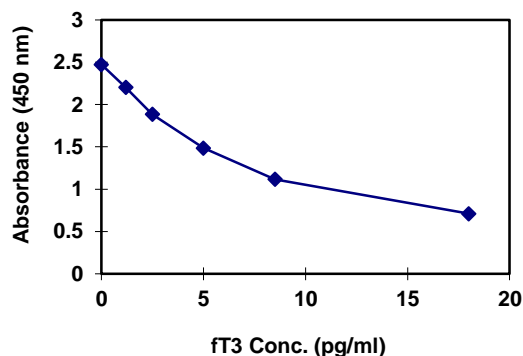
## 9 CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule el valor medio de la absorbencia ( $A_{450}$ ) para cada conjunto de estándares de referencia, controles y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar trazando la absorbencia media obtenida para cada estándar de referencia frente a su concentración en pg/mL en papel cuadrículado, con los valores de absorbencia en el eje vertical o Y, y las concentraciones en el eje horizontal o X.
3. Utilice los valores medios de absorbencia de cada muestra para determinar la concentración correspondiente de fT3 en pg/mL a partir de la curva estándar.

### 9.1 Ejemplo de curva estándar

Resultados de una serie típica estándar con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostrados en el eje Y frente a las concentraciones de fT3 mostradas en el eje X. Esta curva estándar únicamente tiene fines ilustrativos y no debe utilizarse para calcular valores desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

fT3 (pg/mL)	Absorbencia (450 nm)
0	2,474
1,2	2,202
2,5	1,884
5,0	1,485
8,5	1,117
18,0	0,710



## 10 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

### 10.1 Exactitud

El sistema de prueba mediante inmunoensayo enzimático (EIA) de microplaca de la FT3 se comparó con un método de radioinmunoensayo con tubo revestido. Se utilizaron muestras biológicas de poblaciones con hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo (valores que oscilaban entre 0,1 pg/mL - 14 pg/mL). El número total de dichas muestras ascendió a 151.

Se calcularon la ecuación por regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación para el presente sistema de prueba de inmunoensayo enzimático (EIA) de la FT3 en comparación con el método de referencia. Los datos obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Método	Media (X)	Análisis por regresión de mínimos cuadrados	Coefficiente
El presente método	3,045	$y = 0,978(x) - 0,116$	0,950
Referencia	2,921		

La proximidad de los valores medios indica únicamente cierto sesgo entre el presente método y el método de referencia. La ecuación por regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación indica una excelente concordancia entre los métodos.

### 10.2 Precisión

La precisión intra- e interensayo del sistema de prueba mediante inmunoensayo enzimático de microplaca de la FT3 se determinaron mediante análisis en tres niveles distintos del grupo de suero de control. El número, los valores medios, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros de control se muestran en las siguientes tablas:

#### Precisión intraensayo (valores en pg/mL)

Muestra	N	X	D.E.	% de C.V.
Bajo	24	1,85	0,09	4,9
Normal	24	4,49	0,16	3,6
Alto	24	8,0	0,25	3,1

#### Precisión interensayo (valores en pg/mL)\*

Muestra	N	X	D.E.	% de C.V.
Bajo	12	2,16	0,29	13,1
Normal	12	5,09	0,40	7,9
Alto	12	9,13	0,94	10,2

\*Tal y como se ha medido en diez experimentos por duplicado durante un periodo de diez días.

### 10.3 Especificidad

La reactividad cruzada del anticuerpo de triyodotironina respecto a las sustancias seleccionadas se evaluó añadiendo la sustancia interferente a una matriz de suero con distintas concentraciones. La reactividad cruzada se calculó al obtener un cociente entre la dosis de la sustancia interferente respecto a la dosis de triyodotironina necesaria para desplazar la misma cantidad del marcador.

Sustancia	Reactividad cruzada	Concentración
I-triyodotironina	1,0000	-
I-tiroxina	< 0,0002	10 µg/mL
Yodotirosina	< 0,0001	10 µg/mL
Diyodotirosina	< 0,0001	10 µg/mL
Fenilbutazona	< 0,0001	10 µg/mL
Salicilato de sodio	< 0,0001	10 µg/mL

#### 10.4 Sensibilidad

El procedimiento de EIA de la fT3 presenta una sensibilidad de 0,05 pg/mL. La sensibilidad se determinó al establecer la variabilidad del calibrador de suero de 0 pg/mL y al utilizar las  $2\sigma$  (95% de fiabilidad) estadísticas para calcular la dosis mínima.

#### 11 VALORES ESPERADOS

Se llevó a cabo un estudio de la población adulta con eutiroidismo para determinar los valores esperados para el sistema de prueba de EIA de la fT3. Los valores medios ( $X$ ), las desviaciones estándar ( $\sigma$ ) y los intervalos esperados ( $\pm 2\sigma$ ) se muestran en la siguiente tabla:

**Valores esperados para el ELISA de T3 libre (en pg/mL)**

	<b>Adulto (110 muestras)</b>	<b>Embarazo (75 muestras)</b>
Media ( $X$ )	2,8	3,0
Desviación estándar ( $\sigma$ )	0,7	0,6
Intervalos esperados ( $\pm 2\sigma$ )	1,4 - 4,2	1,8 - 4,2

Es importante tener en cuenta que el establecimiento de un intervalo de valores que caben esperar de un método concreto para una población de personas «normales» depende de varios factores: la especificidad del método, la población analizada y la precisión del método en las manos del analista. Por estos motivos, cada laboratorio debe depender del intervalo de valores esperados establecidos por el fabricante solo hasta que los analistas puedan determinar un intervalo interno mediante el método con una población autóctona de la zona en la que se encuentra el laboratorio.


#### 12 SIGNIFICADO CLÍNICO

Las alteraciones en las concentraciones de las proteínas de fijación del suero por lo general conllevarán una correspondiente modificación de las concentraciones totales de T3, mientras que el nivel fisiológicamente activo de la fT3 permanecerá en su mayor parte inalterado en una persona con eutiroidismo. Por lo tanto, la determinación de la concentración de fT3 puede ofrecer una evaluación más precisa del estado de la tiroides que el análisis total de la T3. Las concentraciones elevadas de fT3 indican hipertiroidismo y los niveles bajos son un signo de hipotiroidismo.

#### 13 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con un conocimiento total de las instrucciones del prospecto del envase y cumpliendo las buenas prácticas de laboratorio.
2. El procedimiento de lavado resulta fundamental. Un lavado insuficiente conllevará una baja precisión y lecturas de absorbencia que aparezcan erróneamente como elevadas.
3. Las muestras de suero que muestren lipemia intensa, hemólisis intensa o turbidez no deben usarse con esta prueba.
4. Los resultados obtenidos con este kit únicamente deben usarse como apoyo a otros procedimientos de diagnóstico e información disponible para el médico.

**SYMBOLS USED**

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las instrucciones de uso	Consultare le istruzioni per l'uso
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformité aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Numéro de catalogue	Número de catálogo	Numero di Catalogo
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	Numéro de lot	Número de lote	Numero di lotto
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<b>Distributed by</b>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
<b>Content</b>	Content	Inhalt	Conditionnement	Contenido	Contenuto
<b>Volume/No.</b>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantité	Volumen/Número	Volume/Quantità