

СОДЕРЖАНИЕ

1. НАЗНАЧЕНИЕ	2
2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА	3
3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ	3
4. СОСТАВ НАБОРА	4
5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ	5
6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ	5
7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА	5
8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА	6
9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА	7
10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ	8
11. ЛИТЕРАТУРА	8

CONTENT

1. INTENDED USE	9
2. SUMMARY AND EXPLANATION	9
3. PRINCIPLE OF THE TEST	10
4. WARNINGS AND PRECAUTIONS	10
5. KIT COMPONENTS	11
6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE	12
7. TEST PROCEDURE	12
8. QUALITY CONTROL	14
9. CALCULATION OF RESULTS	14
10. EXPECTED VALUES	15
11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	15
12. LITERATURE	15

Инструкция составлена Руководителем службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикиным

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРИЙОДИРОНИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «ТЗ-ИФА»

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «ТЗ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации трийодтиронина в сыворотке (плазме) крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Трийодтиронин (ТЗ) – гормон с молекулярной массой 651 дальтон, 58% которого составляет йод. Тироксин (Т4) и 3,5,3'-трийодтиронин (ТЗ) – гормоны, вырабатываемые щитовидной железой и циркулирующие в крови как в свободной, так и в связанной форме – в основном, с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ). Гормональной активностью обладают только свободные ТЗ и Т4, однако их доля очень мала: 0.03% от общего содержания для Т4 и 0.3% – для ТЗ. Концентрация ТЗ ниже, чем Т4, однако его метаболическая активность примерно в 3 раза выше. Около 80% сывороточного ТЗ образуется за счет дейодирования Т4 в периферических тканях, и только небольшое его количество образуется прямым синтезом в щитовидной железе. Поэтому при гипотиреозе уровень ТЗ может длительное время находиться на нижнем пределе нормы, так как его потеря может компенсироваться повышенным превращением Т4 в ТЗ. Показаниями к определению общего ТЗ служит начальная стадия гиперфункции щитовидной железы; дифференциальная диагностика гипертиреоза; рецидив гипертиреоза; острый гипертиреоз после лечения L-тироксина. Количественное определение общего ТЗ особенно информативно при ТЗ-тиреотоксикозе, т.к. у 5–10% больных уровень Т4 существенно не изменяется, а концентрация ТЗ резко увеличивается. При гипотиреозе диагностическая ценность определения ТЗ невелика, т.к. часто при клинических признаках гипотиреоза показатели ТЗ остаются в норме. Повышение уровня ТЗ наблюдается при ранней недостаточности функции щитовидной железы, приеме эстрогенов, пероральных контрацептивов, героина, метадона, эндемическом зобе. Во время беременности уровень ТЗ возрастает в несколько раз, а затем нормализуется после родов в течение нескольких дней. Снижение уровня ТЗ отмечается при гипофункции щитовидной железы, остром и подостром тиреоидите, после приема андрогенов, дексаметазона, салицилатов, производных кумарина.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение трийодтиронина основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к ТЗ. Трийодтиронин из образца конкурирует с конъюгированным ТЗ за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации трийодтиронина в исследуемом образце. Концентрацию трийодтиронина в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания трийодтиронина в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция кроличьих поликлональных антител к ТЗ с другими анализатами приведена в таблице:

Аналит	Перекрестная реакция, %
L-ТЗ	100
D-ТЗ	100
L-тироксин	0.01
D-тироксин	0.04

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания ТЗ в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «ТЗ-ИФА» не превышает 8,0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации ТЗ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей ТЗ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.75–15 нмоль/л и составляет $\pm 10,0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации ТЗ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1.5 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «ТЗ-ИФА» концентрация ТЗ в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.4 нмоль/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1 P211Z	SORB MTP	Планшет 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2 C211Z	CAL 1-5	Калибровочные пробы на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества трийодтиронина - 0; 0.75; 1.5; 7.5; 15 нмоль/л , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	5	шт.	прозрачные жидкости синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3 Q211Z	CONTROL	Контрольная сыворотка на основе сыворотки крови человека с известным содержанием трийодтиронина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4 T211XZ	CONJ 2X	Концентрат конъюгата (3 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5 ST211Z	DIL CONJ	Буфер для разведения концентрата конъюгата , готов к использованию (3 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
6 R055Z	SUBS TMB	Раствор субстрата тетраметилбензида (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7 S008Z	BUF WASH 21X	Концентрат отмывочного раствора , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8 R050Z	STOP	Стоп-реагент , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9 N003	-	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	-
10 K211I	-	Инструкция по применению Набора реагентов «ТЗ-ИФА»	1	шт.	-
11 K211Q	-	Паспорт контроля качества Набора реагентов «ТЗ-ИФА»	1	шт.	-

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 2а (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5,0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противозидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 500 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдерживать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 500 мл, добавить 440 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 21 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 20 мл дистиллированной воды).

7.4. Приготовление конъюгата. Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 2 раза буфером для разведения концентрата конъюгата.

ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки!

Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 400 мкл конъюгата: 200 мкл концентрата конъюгата + 200 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «ТЗ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 5 суток. Не допускается замораживание целого набора.

Допускается однократное замораживание (-20 °С) калибровочных проб и контрольной сыворотки в аликвотах.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 42 исследуемых образцов, 5 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- концентрат конъюгата, Буфер для разведения концентрата конъюгата, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 5 суток или при температуре +2...+8 °С не более 30 суток;

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации ТЗ в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	Приготовьте конъюгат: для этого разбавьте концентрат конъюгата в 2 раза буфером для разведения концентрата конъюгата. ВНИМАНИЕ! Разбавленный раствор конъюгата не хранится! Разбавляйте только ту часть концентрата конъюгата, которая необходима для данной постановки! Пример: на 1 стрип (8 лунок) потребуется 400 мкл конъюгата; 200 мкл концентрата конъюгата + 200 мкл буфера для разведения концентрата конъюгата.
3	Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5–10 минут.
4	Внесите во все лунки по 50 мкл конъюгата.
5	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 30 минут при температуре +37 °С.
6	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз. При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
7	Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензида. Внесение раствора субстрата тетраметилбензида в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25°C) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания.
8	Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензида, по 100 мкл стоп-реагента , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет.
9	Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реагента. Бланк фотометра выставьте по воздуху.
10	Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (х) – десятичный логарифм концентрации ТЗ в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (у) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например, 0,001 нмоль/л
11	Определите по калибровочному графику содержание ТЗ в исследуемых образцах.

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций ТЗ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.4 нмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (15 нмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация ТЗ ниже 0.4 нмоль/л или выше 15 нмоль/л.

В Наборе «ТЗ-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в нмоль/л следует умножить на 0.65.

$$1 \text{ нмоль/л} = 0.65 \text{ нг/мл}$$

Исследуемая группа	Единицы, нмоль/л		Единицы доп., нг/мл	
	Нижний предел	Верхний предел	Нижний предел	Верхний предел
здоровые доноры	1.2	3.2	0.8	2.1

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Physiology of thyroid hormones. IN: Division of Drugs and Toxicology, American Medical Association: Drug Evaluations Annual 1995. Amer Med Assn, Chicago, 1995, ch 47, pp 1039-1040.
2. Robins J & Rall JE. The Iodine -Containing Hormones. IN Hormones in Blood (2nd ed) 1: 383-490, Gray CH & Bacharach AL (eds) London Academic Press, 1987

По вопросам, касающимся качества Набора «ТЗ-ИФА», следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, Москва, а/я 58,
тел./факс: (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqc@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

Instruction for use

A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRIIODOTHYRONINE IN HUMAN BLOOD SERUM OR PLASMA

1. INTENDED USE

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of triiodothyronine in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of triiodothyronine in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 42 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Thyroid hormones thyroxin (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3) exert regulatory influences on growth, differentiation, cellular metabolism and development of skeletal and organ systems. T4 and T3 in blood are found both in free and bound form – mostly, they are bound to thyroxin binding globulin (TBG). Only free forms of T3 and T4 exert hormonal activity also their percentage is very low – 0.3% for T3 and 0.03% for T4.

The concentration of T3 is much less than that of T4 but its metabolic activity is about 3 times greater. About 80% of T3 is produced in peripheral tissues by deiodination of T4, and only 20% is secreted by thyroid gland. That is why in hypothyroid patients T3 level may for a long time remain on the lower limit of the normal range, because its loss may be compensated by enhanced conversion of T4 into T3.

Determination of T3 level is most useful in T3-hyperthyroidism because 5-10% of such patients do not show significant changes in T4 level while concentration of T3 is highly elevated.

Elevated T3 levels are seen in early thyroid hypofunction, after intake of estrogens, oral contraceptives, heroin, methadone, during pregnancy.

Decreased concentrations of T3 are found in initial stage of hyperthyroidism, acute and subacute thyroiditis, after intake of androgens, dexamethasone, salicylates.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific rabbit polyclonal to T3-antibodies simultaneously with conjugated T3-peroxidase. T3 from the specimen competes with the conjugated T3 for coating antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5,0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5. KIT COMPONENTS

5.1. Contents of the Kit

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1 SORB MTP	T3 EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp.date
2 CAL 1-5	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 5 calibrators: 0; 0.75; 1.5; 7.5; 15 nmol/l	5	pcs	blue (C1 - colourless)	2 months
3 CONTROL	Control serum (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4 CONJ 2X	Conjugate concentrate, 3 ml	1	pcs	blue	Concentrate - until exp.date Diluted - 1 day at +2...+8 °C
5 DIL CONJ	Conjugate dilution buffer, 3 ml	1	pcs	blue	until exp.date
6 SUBS TMB	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
7 BUF WASH 21X	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at +2...+8 °C or 5 days at RT
8 STOP	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp.date
9 N003	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
10 K211I	Instruction T3 EIA	1	pcs		N/A
11 K211Q	QC data sheet T3 EIA	1	pcs		N/A

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0.

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells **TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED)** to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 21X by 21 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units:

1 nmol/l = 0.65 ng/ml

7.5. Assay procedure

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–5 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Prepare working conjugate solution by dilution of conjugate concentrate 2 fold by conjugate dilution buffer. ATTENTION: working conjugate solution is unstable and should not be stored! Prepare the volume required for actual assay run.
3	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–5, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.
4	Dispense 50 µl of working conjugate solution into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
5	Incubate 30 minutes at 37 °C.
6	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
7	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
8	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
9	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
10	Measure OD (optical density) at 450 nm.
11	Set photometer blank on air
12	Apply lin-log method for data reduction.

7.5. Handling notes

Calibrators and control sample(s) – only one freezing/thawing cycle is allowed

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable federal, state, and local standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

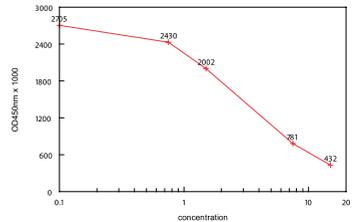
1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus triiodothyronine concentration.

3. Determine the corresponding concentration of triiodothyronine in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm) x 1000
CAL 1	0 nmol/l	2705
CAL 2	0.75 nmol/l	2430
CAL 3	1.5 nmol/l	2002
CAL 4	7.5 nmol/l	781
CAL 5	15 nmol/l	432



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for T4. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

Sex, age	Units, nmol/l		Units alternative, ng/ml	
	Lower limit	Upper limit	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	1.2	3.2	0.8	2.1

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

Analyte	Cross-reactivity, % wt/wt
L-T3	100
D-T3	100
L-Thyroxin	0.01
D-Thyroxin	0.04

11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.4 nmol/l.

11.3. Linearity

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different triiodothyronine concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery

Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known triiodothyronine concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%

12. LITERATURE

1. Physiology of thyroid hormones. IN: Division of Drugs and Toxicology, American Medical Association: Drug Evaluations Annual 1995. Amer Med Assn, Chicago, 1995, ch 47, pp 1039-1040.
2. Robins J & Rall JE. The Iodine -Containing Hormones. IN Hormones in Blood (2nd ed) 1: 383-490, Gray CH & Bacharach AL (eds) London Academic Press, 1987

