



Triiodotironina Libera (fT3) Test System

Codice Prodotto: 1325-300

1.0 INTRODUZIONE

Uso Previsto: Determinazione quantitativa della concentrazione della Triiodotironina Libera nel siero umano con metodo immunoenzimatico. Si ritiene che i livelli di fT3 riflettano la quantità di T3 disponibile per le cellule e può dunque determinare lo stato clinico metabolico del T3.

2.0 DESCRIZIONE DEL TEST

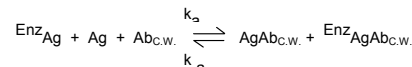
Triiodotironina, ormone tiroideo che circola nel sangue legato a proteine trasportatrici (1,2). La proteina di trasporto principale è la globulina legante la tiroxina (TBG). Tuttavia, solo la porzione libera (non legata) di triiodotironina si crede sia responsabile per l'azione biologica. Inoltre, le concentrazioni delle proteine di trasporto sono alterate in molte condizioni cliniche, quali la gravidanza. Nella normale funzione tiroidea quando si altera la concentrazione delle proteine di trasporto, il livello della triiodotironina totale cambia e la concentrazione di triiodotironina libera rimane costante. Pertanto, la misurazione della concentrazione di triiodotironina libera è correlata con lo stato clinico in modo più affidabile dei livelli di triiodotironina totale. Per esempio, l'incremento dei livelli di triiodotironina totale associato alla gravidanza, ai contraccettivi orali e alla terapia estrogenica comporta livelli maggiori di T3 mentre la concentrazione di T3 libero rimane sostanzialmente invariata. Questo metodo immunoenzimatico su micropietra fornisce sensibilità ottimale e richiede solo pochi passaggi per la determinazione diretta del T3 libero. Con questo metodo, il siero di riferimento, il campione del paziente, o il controllo vengono aggiunti al pozzetto della micropietra. Viene aggiunto il coniugato enzimatico T3 (metodo analogo) e si miscolano i reagenti. Avviene una reazione di competizione tra il coniugato enzimatico e la triiodotironina libera per un numero limitato di anticorpi combinando siti immobilizzati nel pozzetto. A termine del periodo di incubazione richiesto l'anticorpo legato al coniugato enzimatico triiodotironina è separato dal coniugato enzimatico triiodotironina non legato per aspirazione o decantazione. L'attività dell'enzima presente sulla superficie del pozzetto è quantificata mediante reazione con substrato che produce una colorazione. L'impiego di diversi sieri di riferimento con concentrazione nota di triiodotironina libera permette di creare una curva di calibrazione standard. Dal confronto con la curva di riferimento, l'attività non nota di un campione può essere correlata con la concentrazione di triiodotironina libera.

3.0 PRINCIPIO

Metodo immunoenzimatico competitivo TYPE 5 (Metodo analogo per T3 libero)

I reagenti essenziali richiesti per una fase immunoenzimatica solida includono anticorpi immobilizzati T3, coniugato enzimatico T3 e antigene nativo T3 libero. Il coniugato enzimatico T3 non dovrebbe avere nessun legame con le proteine plasmatiche,

specialmente TBG e albumina. Il metodo raggiunge questo scopo. Dopo aver miscelato l'anticorpo immobilizzato, il coniugato enzimatico T3 e un siero contenente l'antigene nativo T3 libero, avviene una reazione competitiva tra il nativo T3 libero e il coniugato enzimatico T3 per un numero limitato di siti leganti insolubilitati. L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



$\text{Ab}_{C.W.}$ = Anticorpi immobilizzati Monospecifici (quantità Costante)

Ag = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

EnzAg = Antigene Enzimatico Coniugato (Quantità Costante)

$\text{AgAb}_{C.W.}$ = Complesso Antigene-Anticorpo

$\text{EnzAgAb}_{C.W.}$ = Complesso Antigene Enzimatico Coniugato - Anticorpo

k_a = Ratio Costante di Associazione

k_{-a} = Ratio Costante di Dissociazione

$K = k_a / k_{-a}$ = Equilibrio Costante

Dopo aver raggiunto l'equilibrio, la frazione di anticorpo legato è separata dall'antigene libero per decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione anticorpo legato è inversamente proporzionale alla concentrazione di antigene nativo libero. Utilizzando diversi sieri di riferimento di concentrazione nota di antigene, può essere generata una curva di riferimento standard da cui accertare la concentrazione non nota dell'antigene.

4.0 REAGENTI

Materiale Fornito

A. Set di Calibratori - 1ml/fiala - Icone A-F

Sei (6) fiacconi di calibratori per triiodotironina libera ad una concentrazione approssimativa* di 0 (A), 1.0 (B), 3.0 (C), 5.0 (D), 8.0 (E) e 16.0 (F) pg/ml. Contengono conservanti. Per unità SI usare il fattore di conversione 1.536 per convertire da pg/ml a pmol/L.

* L'esatta concentrazione è indicata sulle etichette e può variare in funzione del lotto.

B. fT3- Reagente enzimatico - 13ml/fiala - Icona E

Un (1) fialone di triiodotironina - perossidasi di rafano (HRP) coniugata in una matrice stabilizzata di albumina bovina. Contiene conservanti. Conservare a 2° - 8°C.

C. Micropietra coattata con anticorpi T3 - 96 pozzetti - Icona Y

Una micropietra da 96 pozzetti coattata con siero di capra anti triiodotironina confezionata in un foglio di alluminio con agente essiccante. Conservare a 2° - 8°C.

D. Soluzione di lavaggio concentrata - 20ml - Icona D

Un fialone (1) contenente un surnatante in soluzione tampone. Conservare a 2° - 8°C.

E. Substrato A - 7ml/fiala - Icona S^A

Un (1) fialone contenente tetrametilbenzidina (TMB) in buffer. Conservare a 2-8°C.

F. Substrato B - 7ml/fiala - Icona S^B

Un (1) fialone contenente perossido di idrogeno (H₂O₂) in buffer. Conservare a 2-8°C.

G. Soluzione Stop - 8ml/fiala - Icona STOP

Un (1) fialone contenente 1N HCl. Conservare a 2-30°C.

H. Istruzioni d'uso.

4.1 Materiale richiesto ma non fornito:

- Pipetta in grado di erogare volumi di 50µl con una precisione maggiore di 1,5%.
- Dispensatore per erogazioni ripetitive di 0.100ml e 0.350ml volumi con una precisione maggiore di 1,5%.
- Lavatore per micropietra (optional).
- Letto per micropietre in grado di leggere ad assorbanza di 450 nm (lunghezza d'onda di riferimento 620 nm).
- Carta assorbente per asciugare i pozzetti della micropietra.
- Involucro di plastica o coperchio per micropietra per i passaggi in incubazione.

- Aspiratore (optional) per le fasi di lavaggio.
- Timer.
- Kit per il controllo qualità.

Nota 1: Non utilizzare i reagenti dopo la data di scadenza.

Nota 2: I reagenti aperti sono stabili per sessanta (60) giorni se conservati ad una temperatura di 2-8°C.

5.0 PRECAUZIONI

Per uso diagnostico in vitro
Non per uso interno o esterno in soggetti umani o animali

Gli standard presenti nel kit sono stati testati e sono risultati non reattivi per la presenza di HBsAg, HIV e altri agenti infettivi. Poiché nessun metodo attualmente disponibile può offrire assicurazione completa che questi agenti siano assenti, tutti gli standard devono essere considerati come potenzialmente infettivi e devono essere maneggiati con le normali precauzioni.

6.0 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni devono essere sierici. Osservare le normali precauzioni nella raccolta dei campioni. Per un confronto accurato attraverso cui stabilire valori normali, prelevare il campione di mattina a digiuno. Raccogliere il campione per via venosa, in una provetta senza additivi o anti-coagulanti. Lasciare che il sangue coaguli. Centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere conservati a 2-8°C al massimo per cinque (5) giorni. Se il campione non è testato entro questo lasso di tempo, può essere conservato a -20°C fino a 30 giorni. Evitare l'uso di apparecchiature contaminate. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti. Se testato in doppio, è richiesto 0.100 ml di campione.

7.0 CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare controlli con livelli nei range di ipotiroidismo, eutiroidismo e ipertiroidismo per monitorare le prestazioni dei test. Questi controlli devono essere trattati come ignoti ed i valori devono essere determinati in ogni test effettuato. Creare delle tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per verificare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazione del test. Inoltre, la capacità di assorbanza massima dovrebbe essere coerente con l'esperienza passata. Una deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare un cambiamento inavvertito nelle condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti del kit. Utilizzare reagenti nuovi per determinare il motivo delle variazioni.

8.0 PREPARAZIONE DEI REAGENTI:

- Soluzione di lavaggio**
Diluire la soluzione di lavaggio concentrata a 1000 ml con acqua distillata o deionizzata. Conservare a 2-30°C fino ad un massimo di 60 giorni.
- Soluzione di lavoro Substrato**
Versare il contenuto del fialone ambrato etichettato "Soluzione A" nel fialone trasparente etichettato "Soluzione B". Mettere il tappo giallo sul fialone trasparente per un'immediata identificazione. Miscelare ed etichettare di conseguenza. Conservare a 2 - 8°C.

Nota 1: Non utilizzare la soluzione substrato se assume una colorazione blu.

Nota 2: Non utilizzare reagenti contaminati o che presentano sviluppo batterico.

9.0 PROCEDURA DEL TEST

Prima di iniziare il test portare tutti i reagenti, i controlli e i calibratori a temperatura ambiente (20-27°C).

****Il test deve essere eseguito da personale qualificato****

- Utilizzare un pozzetto della micropietra per ciascun calibratore, controllo e campione del paziente da essere testato in duplicato. **Riporre i pozzetti non utilizzati nel sacchetto di alluminio, chiudere ermeticamente e conservare a 2-8°C**

- Pipettare 0.050 ml (50µl) di campione, controllo o standard nell'apposito pozzetto.
- Aggiungere 0.100 ml (100µl) di reagente enzimatico fT3 in ciascun pozzetto.
- Agitare delicatamente la micropietra per 20-30 secondi e coprire.
- Incubare per 60 minuti a temperatura ambiente.
- Eliminare il contenuto della micropietra per decantazione o aspirazione. Se per decantazione, asciugare la piastra con carta assorbente.
- Aggiungere 350 µl di Wash Buffer (vedere la sezione Preparazione dei Reagenti) far decantare (picchiettare e asciugare) o aspirare. Ripetere per altre due volte, per un totale di tre lavaggi. **Può essere utilizzato un lavatore manuale o automatico. Seguire le istruzioni del produttore per un uso corretto.**
- Aggiungere 0.100 ml (100µl) di soluzione di lavoro substrato in tutti i pozzetti (vedere la sezione Preparazione dei Reagenti). **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso ordine per minimizzare le differenze di tempi di reazione tra i pozzetti.**

NON AGITARE LA PIASTRA DOPO L'AGGIUNTA DEL SUBSTRATO

- Incubare a temperatura ambiente per quindici (15) minuti.
- Aggiungere 0.050ml (50µl) di soluzione stop in ogni pozzetto e miscelare delicatamente per 15-20 secondi. **Aggiungere sempre i reagenti nello stesso ordine per minimizzare le differenze di tempi di reazione tra i pozzetti.**
- Leggere l'assorbanza di ogni pozzetto a 450 nm (usando un filtro di riferimento a 620-630nm per minimizzare le imperfezioni tra i pozzetti) con un lettore di micropietre. **Il risultato deve essere letto entro trenta (30) minuti dall'aggiunta della soluzione stop.**

10.0 CALCOLO DEI RISULTATI

Utilizzare una curva standard per determinare la concentrazione di triiodotironina libera in campioni non noti.

- Registrare l'assorbanza ottenuta dal lettore di micropietra come indicato nell'esempio 1.
- Riportare l'assorbanza per ciascun duplicato di standard in funzione della rispettiva concentrazione di fT3 in pg/ml su carta semilogaritmica.
- Tracciare la curva attraverso i punti segnati.
- Per determinare la concentrazione di fT3 in campioni non noti, identificare l'assorbanza media dei duplicati per ogni campione non noto sull'asse verticale del grafico, trovare il punto di intersezione sulla curva e leggere la concentrazione (in pg/ml) sull'asse orizzontale del grafico (i duplicati dei non noti possono essere calcolati come indicato). Nel seguente esempio, l'assorbanza media (1.885) interseca la curva standard della concentrazione di fT3 a 2.1pg/ml (vedi fig. 1).

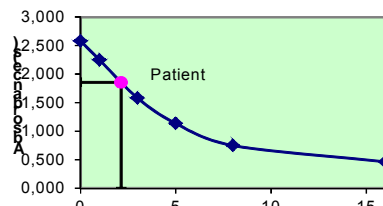
Nota: Per l'elaborazione della curva possono essere utilizzati dei software progettati appositamente per i dosaggi ELISA su micropietra. **Accertarsi della validazione di tali software in caso di utilizzo.**

ESEMPIO 1

Campione I.D.	Well Number	Abs (A)	Mean Abs (B)	Value* (pg/ml)
Cal A	A1	2.658	2.579	0.0
	B1	2.531		
Cal B	C1	2.264	2.248	1.0
	D1	2.233		
Cal C	E1	1.570	1.578	3.0
	F1	1.585		
Cal D	G1	1.124	1.135	5.0
	H1	1.145		
Cal E	A2	0.749	0.748	8.0
	B2	0.748		
Cal F	C2	0.463	0.463	16.0
	D2	0.462		
Patient	E2	1.860	1.855	2.1
	F2	1.849		

I dati presentati nell'esempio 1 e Figura 1 sono esemplificativi e non devono essere utilizzati per calcolare i risultati analitici nei dosaggi dei campioni. **I valori assegnati per i calibratori possono variare in base al lotto.**

Figura 1



11.0 PARAMETRI Q.C.

Affinché i risultati del test risultino attendibili devono essere soddisfatti i seguenti criteri:

- L'assorbanza (OD) del calibratore A deve essere ≥ 1.3 .
- Quattro su sei pool di controllo qualità devono rientrare entro i limiti stabiliti

12.0 PRECAUZIONI

La scheda di sicurezza di questo prodotto è disponibile su richiesta.

12.1 Performance

- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia lo stesso per ottenere risultati riproducibili.
- L'aggiunta del campione non deve essere superiore a dieci (10) minuti per evitare risultati scorretti.
- Non utilizzare campioni altamente lipemici, emolizzati o contaminati.
- Se si utilizza più di una piastra, è raccomandabile generare un'altra curva di riferimento standard. L'aggiunta della soluzione substrato dà inizio ad una reazione cinetica che termina con l'aggiunta della soluzione stop. Pertanto il substrato e la soluzione stop devono essere aggiunte nella stessa sequenza per evitare scarti temporali durante la reazione.
- I lettori di micropiastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- La mancata rimozione della soluzione in fase di lavaggio per aspirazione o decantazione può determinare risultati errati.
- Usare componenti dello stesso lotto. Non interscambiare reagenti di lotti differenti.
- Pipettare in maniera accurata e precisa e il rispetto di tempi e temperature richieste sono essenziali.
- Tutte le norme nazionali applicabili, regolamenti e leggi, tra cui, ma non limitato a, buone procedure di laboratorio, devono essere seguite scrupolosamente per garantire l'utilizzo corretto del dispositivo.
- È importante calibrare le attrezzature, pipette, lettori, lavatoi e/o strumenti automatici utilizzati con questo dispositivo ed eseguire la manutenzione di routine.
- MSDS – come previsto dalla Direttiva 98/79EC – per questo e altri dispositivi possono essere richiesti via mail Monobind@monobind.com.

12.2 Interpretazione

- L'interpretazione dei risultati deve essere eseguita da personale qualificato.
- I risultati di laboratorio sono solo un aspetto per determinare la cura del paziente e non devono essere l'unica base per la terapia, in particolare se in conflitto con altri determinanti.
- Per risultati validi, controlli adeguati e altri parametri devono essere compresi nei range elencati e nei requisiti dei test.
- Se il kit è alterato, miscelando reagenti di diversi kit e produce risultati errati, o se i risultati vengono interpretati in maniera non corretta, Monobind non avrà alcuna responsabilità.
- Se si utilizza un software di riduzione dati, i valori dei calibratori devono cadere entro il 10% delle concentrazioni assegnate.
- Se un campione, per qualche ragione è superiore al report del calibratore più alto (per esempio > 16pg/ml) **Non cercare di diluire il campione. Variazioni di TBG in matrici**

differenti non permetterebbero all'ormone T3 libero di diluirsi.

- Diversi farmaci influenzano il legame di Triiodotironina con l'ormone tiroideo portatore di proteine o il suo metabolismo con il T3 e complica l'interpretazione dei risultati di T3 libero (3).
- Anticorpi circolanti al T3 e inibitori del legame ormonale possono interferire (4).
- L'eparina ha effetti *in vivo* e *in vitro* sulle concentrazioni di T3 libero (5). Pertanto non ottenere campioni in cui è stato utilizzato questo anticoagulante.
- In gravi malattie non tiroidee (NTI) la valutazione dello stato tiroideo risulta abbastanza difficile. Si raccomanda di misurare il TSH per identificare disfunzioni tiroidee (6).
- Disalbuminemie familiari possono produrre risultati errati sui test diretti di T3 libero (7).

"NON UTILIZZARE PER SCREENING NEONATALE"

13.0 RANGE DI VALORI ATTESI

Uno studio su una popolazione adulta normotiroidea è stato effettuato per determinare i valori attesi per l'FT3 AccuBind™ ELISA test system. Il valore medio (X), la deviazione standard (σ) e il range di valori attesi ($\pm 2\sigma$) sono illustrati nella Tabella 1.

TABELLA 1 Valori attesi per Free T3 ELISA Test (in pg/ml)		
	Adulti	Donne in gravidanza
Numero di campioni	110	75
Valore medio (X)	2.8	3.0
Deviazione Standard (σ)	0.7	0.6
Range attesi ($\pm 2\sigma$)	1.4 – 4.2	1.8 – 4.2

È importante tenere presente che stabilire un range di valori attesi attraverso un determinato metodo per una popolazione eutiroidea dipende da una molteplicità di fattori: la specificità del metodo, la popolazione testata e la precisione del metodo. Per queste ragioni ogni laboratorio deve dipendere dal range di valori attesi stabiliti dal produttore solo fino a quando non verrà determinato un range utilizzando una popolazione indigena nell'area in cui è situato il laboratorio.

14.0 CARATTERISTICHE

14.1 Precisione

La precisione del test FT3 AccuBind™ ELISA è stata determinata analizzando tre diversi pool di sieri di controllo. Il numero (N), i valori medi (X), la deviazione standard (σ) e il coefficiente di variazione (C.V.) per ognuno di questi sieri di controllo sono illustrati nella Tabella 2 e 3.

TABELLA 2 Variazione intra-dosaggio (Valori in pg/ml)				
Sample	N	X	σ	C.V.
Low	24	1.85	0.09	4.9%
Normal	24	4.49	0.16	3.6%
High	24	8.00	0.25	3.1%

TABELLA 3 Variazione inter-dosaggio (Valori in pg/ml)				
Sample	N	X	σ	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%

*misurato su 12 saggi in duplicato.

14.2 Sensibilità

Il test FT3 AccuBind™ ELISA ha una sensibilità di 0.05 pg/ml. La sensibilità è stata calcolata determinando la variabilità del calibratore 0 pg/ml e utilizzando 2 σ (95% certezza).

14.3 Accuratezza

Il test FT3 AccuBind™ ELISA è stato confrontato con un kit in chemiluminescenza. Sono stati utilizzati campioni biologici da soggetti eutiroidei, ipotiroidei e ipertiroidei (valori compresi tra 0.1pg/ml – 14pg/ml). Sono stati testati in totale 151 campioni. La minima equazione di regressione quadratica e il coefficiente di correlazione sono stati calcolati per il metodo FT3 AccuBind™ ELISA per confronto con il metodo di riferimento. I dati ottenuti sono illustrati nella tabella 4.

TABELLA 4

Metodo	Mezzo (x)	Minima equazione di Regressione Quadratica	Coefficiente di correlazione
Questo metodo (Y)	3.05	$y = 0.35 + 0.922(x)$	0.902
Riferimento (X)	2.92		

Solo una piccola quantità di discrepanze tra questo metodo e il metodo di riferimento sono indicate dalla vicinanza dei valori medi. La minima equazione di regressione quadratica e il coefficiente di correlazione indicano un eccellente accordo di metodo.

14.4 Specificità

La reattività incrociata degli anticorpi anti-triiodotironina a sostanze selezionate è stata valutata aggiungendo le sostanze interferenti ad una matrice di siero a varie concentrazioni. La reattività incrociata è stata calcolata analizzando la ratio tra la curva delle sostanze interferenti e la curva della triiodotironina necessaria per rimpiazzare la stessa quantità di coniugato.

SOSTANZA	Reattività incrociata	Concentrazione
L-Triiodothyronine	1.0000	---
L-Thyroxine	< 0.0002	10 μ g/ml
Iodothyrosine	< 0.0001	10 μ g/ml
Diiodothyrosine	< 0.0001	10 μ g/ml
Diiodothyronine	< 0.0001	10 μ g/ml
Phenylbutazone	< 0.0001	10 μ g/ml
Sodium Salicylate	< 0.0001	10 μ g/ml

15.0 BIBLIOGRAFIA

- Pederson KO, *Scand J Clin Lab Invest*, **34**, 247 (1974).
- Wild D, *Immunoassay Handbook*, Stockton Press, 339 (1994).
- Wenzel KW, *Metabolism*, **30**, 717 (1981).
- Bhagat C, et al, *Clin Chem*, **29**, 1324 (1983).
- Lundberg PR, et al, *Clin Chem*, **28**, 1241 (1982).
- Melmed S, et al, *J Clin Endocrinol Metab*, **54**, 300 (1982).
- Lalloz MR et al, *Clin Endocrinol*, **18**, 11 (1983).

Revision: 1 Date: 060712 DCO: 0639

Cat #: 1325-300

Size	96(A)	192(B)	480(D)	960(E)
Reagent (fill)	A)	1ml set	1ml set	2ml set x2
	B)	1 (13ml)	2 (13ml)	1(60ml) 2 (60ml)
	C)	1 plate	2 plates	5 plates 10 plates
	D)	1 (20ml)	1 (20ml)	1 (60ml) 2 (60ml)
	E)	1 (7ml)	2 (7ml)	1 (30ml) 2 (30ml)
	F)	1 (7ml)	2 (7ml)	1 (30ml) 2 (30ml)
	G)	1 (8ml)	2 (8ml)	1 (30ml) 2 (30ml)

For Orders and Inquiries, please contact

Monobind Inc.
100 North Pointe Drive
Lake Forest, CA 92630 USA

Tel: +1 949.951.2665 Email: info@monobind.com
Fax: +1 949.951.3539 Web: www.monobind.com

Please visit our website to learn more about our other interesting products and services.



EC REP **CEpartner4U**, Esdoornlaan 13,
3951 DB Maarn, The Netherlands
www.cepartner4u.eu