LDN®
IMMUNOASSAYS AND SERVICES
BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY
LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co. KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Instructions for use

FT3 ELISA 2nd Generation

REF TF E-2100

2°C–8°C Σ 96 IVD CE

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Free Triiodothyronine by an enzyme immunoassay in human serum. For *in vitro diagnostic* use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabelled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microplate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of fT3 in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of fT3 in patient samples and controls can be directly read.

The labelled T3 (conjugate) employed in this assay system has shown no substantial binding properties towards thyroxine-binding globulin (TBG) or human serum albumin (HSA). The binding sites on the microplates are designed to be of a low binding-capacity in order not to disturb the equilibrium between T3 and its carrying proteins. The assay is carried out under normal physiological conditions of pH, temperature and ionic strength.

CLINICAL APPLICATIONS

Triiodothyronine (T3) is a thyroid hormone found circulating in the bloodstream. T3 contains three iodine atoms and is produced largely through the extrathyroidal conversion of thyroxine (T4), the principal thyroid hormone with four iodine atoms. Most of the T3 that circulates in the blood is bound to carrier proteins such as TBG, pre-albumin and albumin. The free fraction of T3 (fT3), which represents only 0.25% of the total amount, is considered to be the physiological active fraction.

Total T3 levels depend not only on thyroid status and the peripheral conversion of T4 to T3, but also on the concentration of thyroid hormone-binding proteins. Free T3 (fT3) on the other hand, is largely unaffected by variations in these carrier proteins which can occur under conditions such as pregnancy, estrogen therapy and the use of oral contraceptives. Therefore, free T3 typically reflects a patient's actual thyroid status more reliably than total T3.

Measurement of free T3 is generally recommended for patients with symptoms of hyperthyroidism as found in Graves' disease, toxic adenoma and toxic multinodular goiter.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A standard curve must be established for every run.
7. The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of fT3 in human serum. The kit is not calibrated for the determination of fT3 in other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric orimproperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Samples reading higher than 40 pg/ml should be reported as such and should not be diluted. Dilution will alter the existing equilibrium and may lead to false results.
5. The interpretation of free T3 results can be complicated by a variety of drugs, severe nonthyroidal illness and some rare conditions such as familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH). For diagnostic purposes, the results of this assay should always be used in combination with the clinical examination, medical history and other findings.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS
POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. No test method however, can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogenperoxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.1 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4 – 5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4 °C for up to 24 hours or at -10 °C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipette to dispense 25, 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. A 37 °C incubator
5. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 11)

REAGENTS PROVIDED

1. AA E-0030 WASH-CONC 10X **Wash Buffer Concentrate** – Requires Preparation **X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

2. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate** – Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopping Solution** – Ready To Use.

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Hazards identification:

H315 Causes skin irritation.
H319 Causes serious eye irritation.

4. Standards and **Controls** – Ready To Use.

Listed below are approximate concentrations, please refer to bottle labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/vial
TF E-2101	STANDARD A	**Standard A**	0 pg/ml	0.5 ml
TF E-2102	STANDARD B	**Standard B**	2 pg/ml	0.5 ml
TF E-2103	STANDARD C	**Standard C**	4 pg/ml	0.5 ml
TF E-2104	STANDARD D	**Standard D**	8 pg/ml	0.5 ml
TF E-2105	STANDARD E	**Standard E**	16 pg/ml	0.5 ml
TF E-2106	STANDARD F	**Standard F**	40 pg/ml	0.5 ml
TF E-2151	CONTROL 1	**Control 1**	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
TF E-2152	CONTROL 2	**Control 2**		0.5 ml

Contents: fT3 in a human serum-based matrix with a non-mercury preservative. Prepared by spiking serum with a defined quantity of T3.

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards and controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen.
Avoid multiple freezing and thawing cycles.

5. TF E-2113 ASSAY-BUFF **Assay Buffer** – Ready To Use.

Contents: One bottle containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

6. TF E-2131 96 **Rabbit Anti-fT3 Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate** – Ready To Use.

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

7. TF E-2140 CONJUGATE-CONC 50x **fT3-Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate –** Requires Preparation **X50**

Contents: fT3-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 300 µl/vial

Storage: Refrigerate at 2 – 8 °C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:50 in assay buffer before use (eg. 40 µl of HRP in 2 ml of assay buffer). If the whole plate is to be used dilute 240 µl of HRP in 12 ml of assay buffer. Discard any that is left over.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: **None**.

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1.	**Prepare** working solutions of the **fT3-HRP conjugate** and **wash buffer**.
2.	Remove the required number of well strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3.	Pipette **25 µl** of each **standard, control and specimen sample** into correspondingly labelled wells in duplicate.
4.	Pipette **100 µl** of the **conjugate working solution** into each well. *(We recommend using a multichannel pipette.)*
5.	Gently **shake** the plate for **10 seconds**.
6.	**Incubate** the plate at **37 °C for 1 hour**.
7.	Wash the wells 3 times with **300 µl** of **diluted wash buffer** per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry. *(The use of a washer is recommended.)*
8.	Pipette **150 µl** of **TMB substrate** into each well at timed intervals.
9.	**Incubate** the plate at **37°C** for **10–15 minutes.** *(or until standard A attains dark blue colour for desired OD).*
10.	Pipette **50 µl** of **stopping solution** into each well at the same timed intervals as in step 8.
11.	**Read** the plate on a microplate reader at **450 nm** within 20 minutes after addition of the stopping solution.
⚠	*If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.*

CALCULATIONS

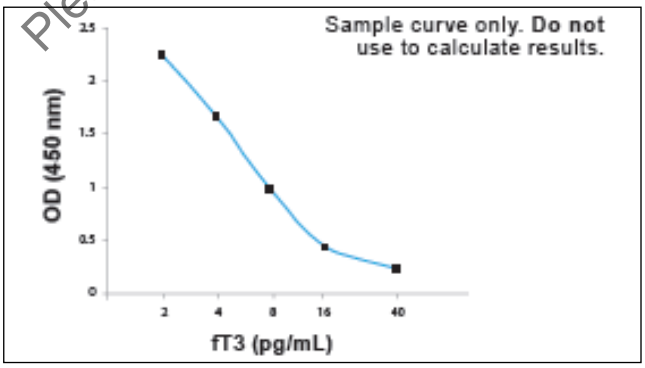
1. Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
2. Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the standard curve.

TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Standard	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
A	2.798	2.734	2.764	0
B	2.284	2.216	2.250	2
C	1.697	1.638	1.668	4
D	1.002	0.956	0.979	8
E	0.452	0.437	0.444	16
F	0.247	0.238	0.242	40
Unknown	1.460	1.439	1.450	4.8

TYPICAL STANDARD CURVE



Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY
The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the Direct fT3 ELISA kit is **0.3 pg/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)
The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct fT3 ELISA kit with T3 cross-reacting at 100%:

Compound	% Cross Reactivity
L-Triiodothyronine	100
D-Triiodothyronine	34
Triiodothyropropionic acid	20
Diiodo-D-thyronine	0.5
D-Thyroxine	0.3
L-Thyroxine	0.9

The following compounds were tested but cross-reacted at less than 0.1%: Diiodotyrosine, Iodotyrosine, Phenytoin, Sodium Salicylate and r-Triiodothyronine.

INTRA-ASSAY PRECISION
Three samples were assayed ten times each on the same standard curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	5.182	0.501	9.7
2	8.560	0.598	7.0
3	48.200	1.686	3.5

INTER-ASSAY PRECISION
Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	3.306	0.284	8.6
2	5.154	0.402	7.8
3	8.698	0.713	8.2

EXPECTED NORMAL VALUES
As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values. The following reference range (pg/ml) was established with 44 apparently healthy adults:

Group	N	Mean	Central 95% Range
Euthyroid Adults	44	3.7	2.2 – 5.3

EFFECT OF THYROXINE BINDING GLOBULIN (TBG)
The purpose of this study was to investigate a possible interference caused by the binding of TBG to the fT3-HRP conjugate. The standard A was spiked with purified TBG and assayed.
The results are tabulated below:

TBG (µg/ml added)	OD	% B/B_0
0	1.255	100
12.5	1.229	98
25	1.170	93
50	1.137	91
100	1.168	93
200	1.174	94
400	1.118	89

The results show no binding of labelled T3 to TBG even at higher than normal levels. In conclusion, results showed that there was no significant influence by TBG in the Direct Free T3 Direct ELISA Kit.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

EFFECT OF HUMAN SERUM ALBUMIN (HSA)

The purpose of this study was to investigate a possible interference of HSA on the assay procedure. The Standard A was spiked with purified HSA and assayed.
The results are tabulated below:

HSA (mg/ml added)	OD	% B/B_0
0	1.255	100
3.125	1.228	98
6.25	1.331	100
12.5	1.245	99
25	1.197	95
50	1.217	97
100	1.063	85

The results show no significant binding of labelled T3 to HSA even at higher than normal levels.

EFFECT OF NON-ESTERIFIED FATTY ACIDS (NEFA)

The purpose of this study was to investigate a possible interference of NEFA on the assay procedure. Two samples were spiked with oleic acid and assayed.
The results are tabulated below:

NEFA (mmol/l added)	Sample 1 (pg/ml)	Sample 2 (pg/ml)
0	4.4	8.7
0.5	4.6	7.5
3.5	4.6	8.3
25	4.6	10.9

The results show that NEFA may increase the free T3 values, only at higher than normal concentrations.

EFFECT OF LIPEMIA

The purpose of this study was to investigate a possible interference of lipemic samples on the assay procedure. Two samples were spiked with triglycerides and assayed.
The results are tabulated below:

Triglycerides (mg/dl added)	Sample 1 (pg/ml)	Sample 2 (pg/ml)
0	4.4	8.7
50	5.5	9.9
75	5.9	10.8

Results show that lipemic samples may increase the free T3 values. Therefore, lipemic samples should not be used in this assay.

REFERENCES

1. Mullinger RN, et al. Free Triiodothyronine in Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1993; 39(7):1555.
2. Wilkins TA, et al. Assay Performance and Tracer Properties for Two Analog-based of Free Triiodothyronine. Clin Chem. 1986; 32(3):465–9.
3. Ekins R. Measurement of Free Hormones in Blood. Endocr Rev. 1990; 11(1):5–46.
4. John R, et al. Concentration of Free Thyroxine and Free Triiodothyronine in Serum with Patients with Thyronine and Triiodothyronine Binding Autoantibodies. Clin Chem. 1990; 36(3):470–3.
5. Chopra IJ. RIA of iodothyronines. In: Abraham GE ed. Handbook of radioimmunoassay. New York: Marcel Dekker Inc; 1997:679.
6. Demers LM. Thyroid function testing and automation. J Clin Ligand Assay. 1999; 22:38.
7. Kalra J, Hart IR. Value of Free Thyroxine (FT4), Free Tri-iodothyronine (FT3) and Sensitive Thyrotropin (TSH) Assay in the Assessment of Optimal Thyronine Therapy. Clin Biochem. 1987; 20(4):265–7.
8. Bergmann PJ, Van Tricht L. Free Triiodothyronine in Hypo-thyroidism and Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1994; 40(3):496–7.
9. Cohen JH, et al. Thyrotoxicosis Due to Ingestion of Excess Thyroid Hormone. Endocr Rev. 1993; 10(2):113–24.
10. Ingbar SH, et al. A New Method for Measuring the Free Thyroid Hormone in Human Serum and an Analysis of the Factors That Interference its Concentration. J Clin Invest. 1965; 44(10):1679–89.
11. Pedersen KO. Simultaneous Determination of the Free Thyroxine and Triiodothyronine Fractions in Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1974; 34(3):241–6.
12. Weeke J, Orskov H. Ultrasensitive Radioimmunoassay for Direct Determination of Free Triiodothyronine Concentration in Human Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1975; 35(3):237.
13. Oddie TH et al. Triiodothyronine Turnover in Euthyroid Subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1971; 33:653.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

14. Nauman JA, et al. Total and Free Triiodothyronine in Human Serum. J Clin Invest. 1967; 46(8):1346–55.

CHANGE HISTORY

Previous Version:	6.0a	**New Version:**	6.0b
Changes:	***REAGENTS PROVIDED*** Hazard labelling for component AA E-0080 updated		

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date	LOT	Batch code	IVD	For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use	CONT	Content	CE	CE marking of conformity
	Caution	REF	Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

VERWENDUNGSZWECK

Zur direkten quantitativen Bestimmung von freiem Trijodthyronin durch einen Enzymimmunoassay in Humanserum.
Nur für die In-vitro-Diagnostik geeignet.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzym-Immunoassay-Tests folgt dem typischen Szenario der kompetitiven Bindung. Ein unmarkiertes Antigen (das in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden ist) und ein enzymmarkiertes Antigen (Konjugat) konkurrieren um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte. Durch das Waschen und Dekantieren wird ungebundenes Material entfernt. Nach dem Waschschritt wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Absorption wird mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von fT3 in der Probe. Anhand einer Reihe von Standards wird eine Standardkurve erstellt, an der die fT3-Menge in Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden kann.
Das in diesem Testsystem verwendete markierte T3 (Konjugat) hat keine wesentlichen Bindungseigenschaften gegenüber thyroxinbindendem Globulin (TBG) oder Humanserumalbumin (HSA) gezeigt. Die Bindungsstellen auf den Mikrotiterplatten sind so konzipiert, dass sie eine geringe Bindungskapazität aufweisen, um das Gleichgewicht zwischen T3 und seinen Trägerproteinen nicht zu stören. Der Assay wird unter normalen physiologischen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur und Ionenstärke) durchgeführt.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Trijodthyronin (T3) ist ein Schilddrüsenhormon, das in der Blutbahn zirkuliert. T3 enthält drei Jodatome und wird hauptsächlich durch die extrathyreoidale Umwandlung von Thyroxin (T4), dem wichtigsten Schilddrüsenhormon mit vier Jodatomen, gebildet. Der größte Teil des T3, der im Blut zirkuliert, ist an Trägerproteine wie TBG, Präalbumin und Albumin gebunden. Die freie Fraktion von T3 (fT3), die nur 0,25% der Gesamtmenge ausmacht, gilt als die physiologisch aktive Fraktion.
Der Gesamt-T3-Spiegel hängt nicht nur vom Schilddrüsenstatus und der peripheren Umwandlung von T4 in T3 ab, sondern auch von der Konzentration der schilddrüsenhormonbindenden Proteine. Freies T3 (fT3) hingegen wird von Schwankungen dieser Trägerproteine, die unter Bedingungen wie Schwangerschaft, Östrogentherapie und Einnahme oraler Kontrazeptiva auftreten können, weitgehend unbeeinflusst. Daher spiegelt das freie T3 in der Regel den tatsächlichen Schilddrüsenstatus eines Patienten zuverlässiger wider als das Gesamt-T3.
Die Messung des freien T3 wird im Allgemeinen für Patienten mit Symptomen einer Schilddrüsenüberfunktion empfohlen, wie sie bei Morbus Basedow, toxischen Adenomen und toxischen multinodulären Struma auftreten.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Für die erfolgreiche Verwendung dieses Kits sollten die Benutzer dieses Protokoll genau verstehen. Zuverlässige Ergebnisse werden nur bei strikter und sorgfältiger Befolgung der Anweisungen erzielt.
2. Bei jedem Lauf sollten Kontrollmaterialien oder Serumpools in hoher und niedriger Konzentration mitgeführt werden, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu beurteilen.
3. Wenn die Verwendung von Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution vorgeschrieben ist, ist deionisiertes oder destilliertes Wasser zu verwenden.
4. Um die Exposition gegenüber potenziell schädlichen Substanzen zu verringern, sollten beim Umgang mit Kit-Reagenzien und menschlichen Proben Handschuhe getragen werden.
5. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
6. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
7. Die Kontrollen sollten in jeden Lauf einbezogen werden und innerhalb der festgelegten Vertrauensgrenzen liegen.
8. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
9. Beim Ablesen der Mikrotiterplatte beeinträchtigt das Vorhandensein von Blasen in den Wells die optischen Dichten (ODs). Entfernen Sie vor dem Ablesen vorsichtig alle Blasen.
10. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
11. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
12. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.

Please use only the valid version of the instructions for use provided with the kit

13. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfalldatum auf dem Etikett verwendet werden.
14. Die Reagenzien des Kits sind als Sondermüll zu betrachten und entsprechend den nationalen Vorschriften zu entsorgen.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien des Kits sind für die direkte Bestimmung von fT3 in Humanserum kalibriert. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von fT3 in anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs kalibriert.
2. Verwenden Sie kein stark hämolysiertes, stark lipämisches, ikterisches oder unsachgemäß gelagertes Serum.
3. Proben oder Kontrollseren, die Azid oder Thimerosal enthalten, sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Proben, die einen Wert von mehr als 40 pg/ml aufweisen, sind als solche zu melden und sollten nicht verdünnt werden. Eine Verdünnung verändert das bestehende Gleichgewicht und kann zu falschen Ergebnissen führen.
5. Die Interpretation der Ergebnisse für freies T3 kann durch eine Vielzahl von Medikamenten, schwere Nicht-Schilddrüsenerkrankungen und einige seltene Erkrankungen wie die familiäre dysalbuminämische Hyperthyroxinämie (FDH) erschwert werden. Für diagnostische Zwecke sollten die Ergebnisse dieses Tests immer in Verbindung mit der klinischen Untersuchung, der Krankengeschichte und anderen Befunden verwendet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE
POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen getestet und als nicht reaktiv befunden. Es wurde auch auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen HCV und das humane Immunschwächevirus (HIV) getestet und als negativ befunden. Keine Testmethode kann jedoch die vollständige Sicherheit bieten, dass HIV, HCV und Hepatitis-B-Viren oder andere Infektionserreger nicht vorhanden sind. Die Reagenzien sind als potenzielles biologisches Risiko zu betrachten und mit denselben Vorsichtsmaßnahmen zu behandeln, die für jede Blutprobe gelten.

CHEMISCHE GEFAHREN

Vermeiden Sie den Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid und Schwefelsäure enthalten. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien mit reichlich Wasser waschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Für eine Doppelbestimmung werden ca. 0,1 ml Serum benötigt. 4 – 5 ml Blut in ein entsprechend beschriftetes Röhrchen geben und gerinnen lassen. Zentrifugieren und entfernen Sie vorsichtig die Serumschicht. Bis zu 24 Stunden bei 4 °C lagern oder bei -10 °C oder niedriger, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle menschlichen Proben als mögliches biologisch gefährliches Material und treffen Sie entsprechende Vorsichtsmaßnahmen bei der Handhabung.

PROBENVORBEREITUNG

Bei diesem Test handelt es sich um ein direktes System; eine Vorbehandlung der Proben ist nicht erforderlich.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipette zur Abgabe von 25, 50, 100, 150 und 300 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder deionisiertes Wasser
4. Ein 37 °C-Inkubator
5. Mikroplatten-Lesegerät mit einem Filter bei 450 nm und einer oberen OD-Grenze von 3,0 oder mehr* (siehe Assay-Verfahren Schritt 11)

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

1. AAE-0030 WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat –** erfordert eine Vorbereitung **X10**

Inhalt:	Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
Volumen:	50 ml/Fläschchen
Lagerung:	Gekühlt bei 2 – 8 ˚C
Stabilität:	12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.
Vorbereitung:	Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

2. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche mit Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem nicht DMF- oder DMSO-haltigen Puffer.

Volumen: 16 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.

Volumen: 6 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Mögliche Gefahren:

H315 Verursacht Hautreizungen.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.

4. Standards und **Kontrollen** – Gebrauchsfertig.

Die folgenden Angaben sind ungefähre Konzentrationen, die genauen Konzentrationen finden Sie auf den Etiketten der Fläschchen:

Katalognr.	Symbol	Standard	Konzentration	Volumen/ Fläschchen
TF E-2101	STANDARD A	**Standard A**	0 pg/ml	0,5 ml
TF E-2102	STANDARD B	**Standard B**	2 pg/ml	0,5 ml
TF E-2103	STANDARD C	**Standard C**	4 pg/ml	0,5 ml
TF E-2104	STANDARD D	**Standard D**	8 pg/ml	0,5 ml
TF E-2105	STANDARD E	**Standard E**	16 pg/ml	0,5 ml
TF E-2106	STANDARD F	**Standard F**	40 pg/ml	0,5 ml
TF E-2151	CONTROL 1	**Kontrolle 1**	Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett!	0,5 ml
TF E-2152	CONTROL 2	**Kontrolle 2**		0,5 ml

Inhalt: fT3 in einer Matrix auf Humanserumbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel. Hergestellt durch Aufstockung des Serums mit einer bestimmten Menge T3.

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate in ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Nach dem Öffnen sollten die Standards und Kontrollen innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren aufbewahrt werden.

Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

5. TF E-2113 ASSAY-BUFF **Assaypuffer** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche enthält einen Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.

Volumen: 15 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

6. TF E-2131 96 **Mikrotiterplatte mit herausbrechbaren Wells und Kaninchen-Anti-fT3-Antikörper beschichtet** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine mit polyklonalen Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte mit 96 Wells (12x8) in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

7. TF E-2140 CONJUGATE-CONC 50x **fT3-Horseradish Peroxidase (HRP) Konjugatkonzentrat –** erfordert Vorbereitung **X50**

Inhalt: fT3-HRP-Konjugat in einem Puffer auf Proteinbasis mit einem quecksilberfreien Konservierungsmittel.

Volumen: 300 µl/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2 – 8 ˚C

Stabilität: 12 Monate oder wie auf dem Etikett angegeben.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:50 in Assaypuffer verdünnen (z.B. 40 µl HRP in 2 ml Assaypuffer). Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 240 µl HRP in 12 ml Assaypuffer verdünnen. Verwerfen Sie alle Reste.

TESTVERFAHREN

Probenvorbereitung: **Keine**.

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standardlösungen, Kontrollen und Proben sollten in doppelter Ausführung getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Schritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	**Bereiten** Sie Arbeitslösungen des **fT3-HRP-Konjugats** und des **Waschpuffers vor**.
2.	Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
3.	Pipettieren Sie jeweils **25 µl** der **Standards, Kontrollen und Proben** zweifach in entsprechend markierte Wells.
4.	Pipettieren Sie **100 µl** der **Konjugat-Arbeitslösung** in jedes Well. (*Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette*.)
5.	**Schütteln** Sie die Platte vorsichtig **10 Sekunden** lang.
6.	**Inkubieren** Sie die Platte **1 Stunde lang bei 37 °C**.
7.	Waschen Sie die Wells dreimal mit **300 µl verdünntem Waschpuffer** pro Well und klopfen Sie die Platte fest gegen saugfähiges Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist. (*Die Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen*.)
8.	Pipettieren Sie in definierten Zeitintervallen **150 µl TMB-Substrat** in jedes Well.
9.	Die Platte bei **37 °C 10 – 15 Minuten** lang **inkubieren** (*oder bis Standard A bei der gewünschten OD eine dunkelblaue Farbe annimmt*).
10.	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 8 je **50 µl** der **Stopplösung** in die Wells pipettieren.
11.	**Messen** der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei **450 nm** innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
⚠	*Wenn die OD die obere Nachweisgrenze überschreitet oder ein 450-nm-Filter nicht verfügbar ist, kann ein 405- oder 415-nm-Filter verwendet werden. Die optischen Dichten sind dann niedriger, was jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben hat.*

BERECHNUNGEN

1. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standardduplikats.
2. Zeichnen Sie eine Standardkurve auf semi-logarithmischem Papier mit den mittleren optischen Dichten auf der Y-Achse und den Standardkonzentrationen auf der X-Achse. Wenn eine Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
3. Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekannten Duplikats.
4. Lesen Sie die Werte der unbekannten Proben direkt an der Standardkurve ab.

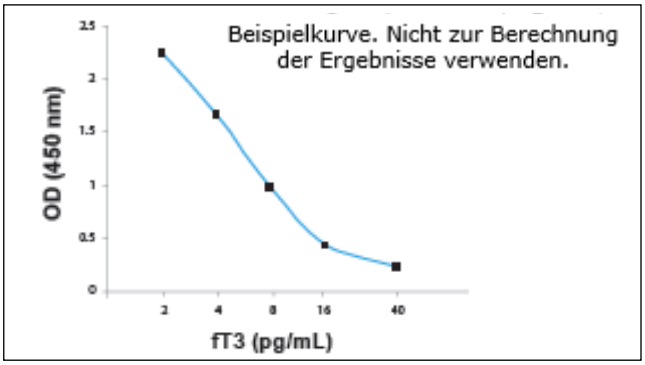
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Nur Beispieldaten. Nicht zur Berechnung von Ergebnissen verwenden.

Standard	OD 1	OD 2	Mittelwert OD	Wert (pg/ml)
A	2,798	2,734	2,764	0
B	2,284	2,216	2,250	2
C	1,697	1,638	1,668	4
D	1,002	0,956	0,979	8
E	0,452	0,437	0,444	16
F	0,247	0,238	0,242	40
Unbekannt	1,460	1,439	1,450	4,8

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

TYPISCHE STANDARDKURVE



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze wird aus der Standardkurve berechnet, indem die sich ergebende Konzentration der mittleren OD des Standards A (basierend auf 10 Wiederholungsanalysen) minus 2 SD bestimmt wird. Die Sensitivität des fT3 ELISA-Kits beträgt daher 0,3 pg/ml.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden auf Kreuzreaktivität mit dem fT3 ELISA-Kit getestet, wobei T3 zu 100% kreuzreagierte:

Komponente	% Kreuzreaktivität
L-Triiodthyronin	100
D-Trijodthyronin	34
Trijodthyreopropionsäure	20
Dijod-D-Thyronin	0,5
D-Thyroxin	0,3
L-Thyroxin	0,9

Die folgenden Verbindungen wurden getestet, zeigten jedoch Kreuzreaktionen von weniger als 0,1%: Diiodotyrosin, Iodotyrosin, Phenytoin, Natriumsalicylat und r-Triiodothyronin.

INTRA-ASSAY PRÄZISION

Drei Proben wurden jeweils zehnmal mit der gleichen Standardkurve untersucht. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Mittelwert	SD	CV%
1	5,182	0,501	9,7
2	8,560	0,598	7,0
3	48,200	1,686	3,5

INTER-ASSAY PRÄZISION

Drei Proben wurden über einen Zeitraum von vier Wochen zehnmal untersucht. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Probe	Mittelwert	SD	CV%
1	3,306	0,284	8,6
2	5,154	0,402	7,8
3	8,698	0,713	8,2

ERWARTETE NORMALWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich von erwarteten Normalwerten festlegen. Der folgende Referenzbereich (pg/ml) wurde bei 44 offensichtlich gesunden Erwachsenen ermittelt:

Gruppe	N	Mittelwert	Mittlere 95%-Spanne
Erwachsene mit Euthyreose	44	3,7	2,2 – 5,3

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

WIRKUNG VON THYROXINBINDENDEM GLOBULIN (TBG)
Ziel dieser Studie war es, eine mögliche Störung durch die Bindung von TBG an das fT3-HRP-Konjugat zu untersuchen. Der Standard A wurde mit gereinigtem TBG aufgestockt und getestet.
Die Ergebnisse sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

TBG (µg/ml zugesetzt)	OD	% B/B_0
0	1,255	100
12,5	1,229	98
25	1,170	93
50	1,137	91
100	1,168	93
200	1,174	94
400	1,118	89

Die Ergebnisse zeigen keine Bindung von markiertem T3 an TBG, selbst bei höheren als den normalen Werten. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass es keinen signifikanten Einfluss von TBG auf das direkte freie T3-Direkt-ELISA-Kit gab.

WIRKUNG VON HUMANEM SERUMALBUMIN (HSA)
Zweck dieser Studie war es, eine mögliche Interferenz von HSA mit dem Assay-Verfahren zu untersuchen. Der Standard A wurde mit gereinigtem HSA versetzt und getestet.
Die Ergebnisse sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

HSA (mg/ml zugesetzt)	OD	% B/B_0
0	1,255	100
3,125	1,228	98
6,25	1,331	100
12,5	1,245	99
25	1,197	95
50	1,217	97
100	1,063	85

Die Ergebnisse zeigen keine signifikante Bindung von markiertem T3 an HSA, selbst bei höheren als den normalen Werten.

WIRKUNG VON NICHT VERESTERTEN FETTSÄUREN (NEFA)
Zweck dieser Studie war es, eine mögliche Beeinflussung des Assayverfahrens durch NEFA zu untersuchen. Zwei Proben wurden mit Ölsäure versetzt und untersucht.
Die Ergebnisse sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

NEFA (mmol/l zugesetzt)	Probe 1 (pg/ml)	Probe 2 (pg/ml)
0	4,4	8,7
0,5	4,6	7,5
3,5	4,6	8,3
25	4,6	10,9

Die Ergebnisse zeigen, dass NEFA die freien T3-Werte erhöhen kann, allerdings nur bei höheren als den normalen Konzentrationen.

AUSWIRKUNG DER BLUTFETTWERTE
Zweck dieser Studie war es, eine mögliche Beeinflussung des Assayverfahrens durch lipämische Proben zu untersuchen. Zwei Proben wurden mit Triglyceriden versetzt und untersucht.
Die Ergebnisse sind nachstehend tabellarisch aufgeführt:

Triglyceride (mg/dl zugesetzt)	Probe 1 (pg/ml)	Probe 2 (pg/ml)
0	4,4	8,7
50	5,5	9,9
75	5,9	10,8

Die Ergebnisse zeigen, dass lipämische Proben die freien T3-Werte erhöhen können. Daher sollten lipämische Proben nicht in diesem Test verwendet werden.

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

LITERATUR

1. Mullinger RN, et al. Free Triiodothyronine in Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1993; 39(7):1555.
2. Wilkins TA, et al. Assay Performance and Tracer Properties for Two Analog-based of Free Triiodothyronine. Clin Chem. 1986; 32(3):465–9.
3. Ekins R. Measurement of Free Hormones in Blood. Endocr Rev. 1990; 11(1):5–46.
4. John R, et al. Concentration of Free Thyroxine and Free Triiodothyronine in Serum with Patients with Thyronine and Triiodothyronine Binding Autoantibodies. Clin Chem. 1990; 36(3):470–3.
5. Chopra IJ. RIA of iodothyronines. In: Abraham GE ed. Handbook of radioimmunoassay. New York: Marcel Dekker Inc; 1997:679.
6. Demers LM. Thyroid function testing and automation. J Clin Ligand Assay. 1999; 22:38.
7. Kalra J, Hart IR. Value of Free Thyroxine (FT4), Free Tri-iodothyronine (FT3) and Sensitive Thyrotropin (TSH) Assay in the Assessment of Optimal Thyronine Therapy. Clin Biochem. 1987; 20(4):265–7.
8. Bergmann PJ, Van Tricht L. Free Triiodothyronine in Hypo-thyroidism and Nonthyroidal Illness. Clin Chem. 1994; 40(3):496–7.
9. Cohen JH, et al. Thyrotoxicosis Due to Ingestion of Excess Thyroid Hormone. Endocr Rev. 1993; 10(2):113–24.
10. Ingbar SH, et al. A New Method for Measuring the Free Thyroid Hormone in Human Serum and an Analysis of the Factors That Interference its Concentration. J Clin Invest. 1965; 44(10):1679–89.
11. Pedersen KO. Simultaneous Determination of the Free Thyroxine and Triiodothyronine Fractions in Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1974; 34(3):241–6.
12. Weeke J, Orskov H. Ultrasensitive Radioimmunoassay for Direct Determination of Free Triiodothyronine Concentration in Human Serum. Scand J Clin Lab Invest. 1975; 35(3):237.
13. Oddie TH et al. Triiodothyronine Turnover in Euthyroid Subjects. J Clin Endocrinol Metab. 1971; 33:653.
14. Nauman JA, et al. Total and Free Triiodothyronine in Human Serum. J Clin Invest. 1967; 46(8):1346–55.

ÄNDERUNGSHISTORIE

Vorherige Version:	6.0a	**Neue Version:**	6.0b
Änderungen:	***MITGELIEFERTE REAGENZIEN*** Gefahrenkennzeichnung der Komponente AA E-0080 aktualisiert		

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

Symbole:

Lagertemperatur	Hersteller	Enthält Testmaterial für <n> Teste
Verwendbar bis	Chargennummer	In vitro Diagnostikum
Gebrauchsanweisung beachten	Inhalt	CE-Kennzeichnung
Achtung	Katalognummer	Vertriebspartner
Herstellungsdatum		