



DCM045-192-4  
Ed. 01/2015

## T4 ELISA

per analisi di routine

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

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 192 test

REF DKO045

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del T4 in siero o plasma umano. Il kit T4 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

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

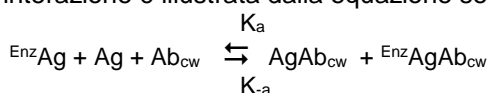
Gli ormoni tiroidei agiscono attraverso un meccanismo sconosciuto per inibire l'attività neuronale; uno degli effetti è il calo della temperatura corporea. Tireotossicosi o ipertiroidismo è la sindrome clinica causata da un eccesso di tiroxina o triiodotironina (o entrambi) libera in circolazione.

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

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

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

L'interazione è illustrata dalla equazione seguente:



Ab<sub>cw</sub>: anticorpo monospecifico immobilizzato (quantità costante)

Ag: antigene nativo (quantità variabile)

EnzAg: antigene coniugato a enzima HRP (quantità costante)

Ag Ab<sub>cw</sub>: complesso antigene-anticorpo

EnzAgAb<sub>cw</sub>: complesso antigene-anticorpo-enzima HRP

K<sub>a</sub>: costante di associazione

K<sub>-a</sub>: costante di dissociazione

K = k<sub>a</sub> / k<sub>-a</sub>: costante di equilibrio

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

L'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 2 mL ciascuno)

CAL0

REF DCE002/4506-0

CAL1

REF DCE002/4507-0

CAL2

REF DCE002/4508-0

CAL3

REF DCE002/4509-0

CAL4

REF DCE002/4510-0

CAL5

REF DCE002/4511-0

2. Control (1 flacone, 2 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/4503-0

3. Conjugate Buffer (1 flacone, 25 mL)

Soluzione tampone con conservanti e inibitori delle proteine di legame

REF DCE002/4501-0

4. Conjugate (1 flacone, 2,8 mL)

T4 coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

(**proteggere dalla luce solare**)

REF DCE002/4502-0

5. Coated Microplate (2 micropiastre breakable)

Anticorpo anti T4 adsorbito sulle micropiastre

REF DCE002/4503-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 22 mL)  
 $H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*)  
**REF DCE004-0**
7. Stop Solution (1 flacone, 22 mL)  
 Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*)  
**REF DCE005-0**
8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 40 mL)  
 NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

### Note

*Conservare i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.*

### 4. AVVERTENZE

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

- Non usare per lo screening dei neonati.

### 5. PRECAUZIONI

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

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
µg/dL	0	2,0	5,0	10,0	15,0	25,0

**La concentrazione dei Calibratori è lotto-specifica; i valori esatti sono riportati nelle etichette e nel Certificato di Analisi per ogni specifico lotto.** Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione del Coniugato diluito

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

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

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 2000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

### 6.4. Preparazione del campione

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

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

### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

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

## 7. CONTROLLO QUALITA'

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

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

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore (C<sub>0</sub>-

C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

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

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

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

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

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

#### 10.1.2. Inter-Assay

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

### 10.2. Accuratezza

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

### 10.3. Sensibilità

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

### 10.4. Specificità

La cross-reattività dell'anti-tiroxina verso determinate sostanze è stata determinata aggiungendo le soluzioni interferenti a una matrice di siero a varie concentrazioni. La cross-reattività è stata calcolata analizzando il rapporto tra la concentrazione di sostanze interferenti e la concentrazione di Tiroxina necessaria per spiazzare la stessa quantità di coniugato.

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

### 10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit T4 Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 114 campioni di siero. La curva di regressione è:  
 (T4 Diametra) = 0,959\*(T4 RIA) + 0,339  
 $r^2 = 0,936$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

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

Ed. 01/2015

DCM045-192-4

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15

20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM045-192-4  
Ed. 01/2015

## T4 ELISA

for routine analysis

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

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 192 test

REF DKO045

### INTENDED USE

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

T4 ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

The thyroid hormone, thyroxine (T4) is produced by the thyroid gland. An important component in the synthesis is iodine. The major form of thyroid hormone in the blood is thyroxine (T4). Thyroxine is converted to the active T<sub>3</sub> (three to four times more potent than T4) within cells by deiodinases (5'-iodinase).

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

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

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

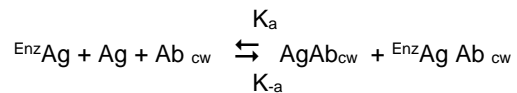
Thyrotoxicosis or hyperthyroidism is the clinical syndrome caused by an excess of circulating free thyroxine, free triiodothyronine, or both.

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

### 2. PRINCIPLE

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

The interaction is illustrated by the following equation:



Ab<sub>cw</sub>: monospecific immobilised antibody (constant quantity)

Ag: native antigen (variable quantity)

EnzAg: antigen conjugated to enzyme HRP (constant quantity)

Ag Ab<sub>cw</sub>: antigen-antibody complex

EnzAg Ab<sub>cw</sub>: antigen-HRP-antibody complex

K<sub>a</sub>: rate constant of association

K<sub>-a</sub>: rate constant of disassociation

K = k<sub>a</sub> / k<sub>-a</sub>: equilibrium constant

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

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

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

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 2 mL each)

CAL0

REF DCE002/4506-0

CAL1

REF DCE002/4507-0

CAL2

REF DCE002/4508-0

CAL3

REF DCE002/4509-0

CAL4

REF DCE002/4510-0

CAL5

REF DCE002/4511-0

##### 2. Control (1 vial, 2 mL)

Concentration of Control is indicated on Certificate of Analysis

REF DCE045/4503-0

##### 3. Conjugate Buffer (1 vial, 25 mL)

Buffered solution with preservative and binding protein inhibitors

REF DCE002/4501-0

##### 4. Conjugate (1 vial, 2,8 mL)

T4 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

(keep away from sunlight) REF DCE002/4502-0

5. Coated Microplate (2 microplate breakable)  
Antibody anti-T4 adsorbed on microplates  
**REF DCE002/4503-0**
6. TMB Substrate (1 vial, 22 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)  
**REF DCE004-0**
7. Stop Solution (1 vial, 22 mL)  
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)  
**REF DCE005-0**
8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 40 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

### Note

Store the reagents at 2-8°C in the dark. Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of kit.

## 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- The concentration of total thyroxine in serum depends on several factors: the function of the thyroid gland and its regulation, thyroxine binding globulin (TBG) and thyroxine binding to TBG. However, the concentration of total thyroxine alone is not sufficient to monitor the clinical status.
- Total serum thyroxine values may increase during pregnancy or administration of oral contraceptives. The table of drugs and interfering conditions in which the values of total thyroxine are affected have been compiled by the Journal of the American Association of Clinical Chemists.
- Not intended for newborn screening

## 5. PRECAUTIONS

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

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
µg/dL	0	2.0	5.0	10.0	15.0	25.0

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

### 6.2. Preparation of diluted Conjugate

Dilute the T4 conjugate 1:11 with Total T4 Conjugate Buffer in a suitable container. For example, dilute 160 µL of conjugate in 1.6 mL of conjugate buffer. This reagent should be used within 24 hours for maximum performance of the assay. Stored at 2-8°C.

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

### 6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 2000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

### 6.4. Preparation of the Sample

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

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

### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

absorbent paper towel.			
<b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

## 7. QUALITY CONTROL

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

## 8. RESULTS

### 8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (E<sub>m</sub>) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E<sub>m</sub>) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calculation of Results

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

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		25 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 1 h at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution. <b>Important note:</b> during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an			



## 9. REFERENCE VALUES

A study of euthyroid adult population was undertaken to determine expected values for the T4 EIA Test System.

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

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a "normal" population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

## 10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay Variation

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

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

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

### 10.2. Accuracy

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

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of T4 that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.4 µg/dL at the 95% confidence limit.

### 10.4. Specificity

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

Substance	Cross Reactivity	Concentration
I-Thyroxine	1.0000	-
d-Thyroxine	0.9800	10 µg/dL
I-Triiodo-thyronine	0.0300	100 µg/dL
d-Triiodo-thyronine	0.0150	100 µg/dL
Monoiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Diiodo-Tyrosine	N/D	100 µg/mL
Triiodothyroacetic Acid	N/D	100 µg/mL
Tetraiodothyroacetic Acid	0.0001	100 µg/mL

### 10.5. Correlation with RIA

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

The linear regression curve was calculated:

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

$$r^2 = 0.936$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

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

Ed. 01/2015

DCM045-192-4

**DiaMetra S.r.l. Headquarter:** Via Calabria 15  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14, 06038 SPELLO (PG)  
Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



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

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

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

**Reazione troppo blanda (OD troppo basse)**

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

**Reazione troppo intensa (OD troppo alte)**

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

**Valori inspiegabilmente fuori scala**

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

**CV% intrasaggio elevato**

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

**CV% intersaggio elevato**

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

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

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

**Too low reaction (too low ODs)**

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

**Too high reaction (too high ODs)**

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

**Unexplainable outliers**

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