

**СОДЕРЖАНИЕ**

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

**CONTENT**

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

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

## **ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ТРИЙОДИТРОНИНА В СЫВОРОТКЕ (ПЛАЗМЕ) КРОВИ «свТЗ-ИФА»**

Рекомендована к утверждению Научно-экспертным советом по медицинским изделиям

### **1. НАЗНАЧЕНИЕ**

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

**1.2.** Тироксин (Т4) и 3,5,3'трийодтиронин (Т3) – гормоны, вырабатываемые щитовидной железой и циркулирующие в крови как в свободной, так и в связанной форме – в основном, с тироксинсвязывающим глобулином (ТСГ). Гормональной активностью обладают только свободные Т3 и Т4, однако их доля очень мала: 0.03% от общего содержания для Т4 и 0.3% – для Т3. Концентрация Т3 ниже, чем Т4, однако его метаболическая активность примерно в 3 раза выше. Около 80% сывороточного Т3 образуется за счет дейодирования Т4 в периферических тканях, и только небольшое его количество образуется прямым синтезом в щитовидной железе. Поэтому при гипотиреозе уровень Т3 может длительное время находиться на нижнем пределе нормы, так как его потеря может компенсироваться повышенным превращением Т4 в Т3. Определение содержания общего и свободного Т3 проводят при начальной стадии гипертиреоза, при рецидиве гипертиреоза, при дифференциальной диагностике гипертиреоза, при симптоматическом повышении уровня Т3, при остром гипертиреозе после подавляющей терапии L-тироксином.

## 2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

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

## 3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

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

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

### 3.2. Воспроизводимость.

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

### 3.3. Линейность.

Зависимость концентрации свТЗ в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свТЗ, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 2.5–40 пмоль/л и составляет  $\pm 10,0\%$ .

### 3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации свТЗ предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 5 пмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

### 3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «свТЗ-ИФА» концентрация свТЗ в сыворотке (плазме) крови не превышает 1 пмоль/л.

## 4. СОСТАВ НАБОРА

Код компонента	Символ	Наименование	Кол-во	Ед.	Описание
1	P213Z	<b>Планшет</b> 96-луночный полистироловый, стрипированный, готов к использованию	1	шт.	-
2	C213Z	<b>Калибровочные пробы</b> на основе сыворотки крови человека, содержащие известные количества свободного триглицеридина – <b>0; 2.5; 5; 10; 20; 40 ммоль/л</b> , готовы к использованию (по 0.8 мл каждая)	6	шт.	прозрачные жидкости ярко-синего цвета (калибровочная проба 0 – прозрачная бесцветная жидкость)
3	Q213Z	<b>Контрольная сыворотка</b> на основе сыворотки крови человека с известным содержанием свободного триглицеридина, готова к использованию (0.8 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
4	T213Z	<b>Конъюгат</b> , готов к использованию (5.2 мл)	1	шт.	прозрачная жидкость синего цвета
5	R055Z	<b>Раствор субстрата тетраметилбензидина</b> (ТМБ), готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
6	S008Z	<b>Концентрат отмывочного раствора</b> , 21х-кратный (22 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
7	R050Z	<b>Стоп-реагент</b> , готов к использованию (11 мл)	1	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
8	N003	Бумага для заклеивания планшета	2	шт.	прозрачная бесцветная жидкость
9	K213I	Инструкция по применению Набора реагентов «свТЗ-ИФА»	1	шт.	-
10	K213Q	Паспорт контроля качества Набора реагентов «свТЗ-ИФА»	1	шт.	-

## 5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

**5.1.** Потенциальный риск применения Набора – класс 1 (ГОСТ Р 51609-2000).

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

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

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

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

## 6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

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

## 7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

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

### 7.2. Приготовление планшета.

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

### 7.3. Приготовление отмывочного раствора.

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

## 8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

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

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

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

**8.2.** Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

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

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

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

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

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

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

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

## 9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

1	Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 14 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки.
2	<b>Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 50 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 50 мкл исследуемых образцов сыоротки (плазмы) крови.</b> Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 5-10 минут.
3	<b>Внесите во все лунки по 50 мкл конъюгата.</b>
4	Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и <b>инкубируйте его в течение 60 минут при температуре +37 °С.</b>
5	По окончании инкубации удалите содержимое лунок и <b>отмойте лунки 5 раз.</b> При каждой отмывке добавьте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге.
6	<b>Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина.</b> Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2-3 мин. <b>Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10-20 минут</b> в зависимости от степени развития синего окрашивания.
7	<b>Внесите во все лунки</b> с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, <b>по 100 мкл стоп-реакента</b> , при этом содержимое лунок окрашивается в яркий желтый цвет.
8	<b>Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре</b> вертикального сканирования <b>при длине волны 450 нм.</b> Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакента. Бланк фотометра выставьте по воздуху.
9	Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации свТЗ в калибровочных пробах (пмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обсчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 пмоль/л к несущественно малой величине, например, 0.001 пмоль/л
10	Определите по калибровочному графику содержание свТЗ в исследуемых образцах.

## 10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

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

**Примечание.** Значения концентраций свТЗ в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (1 пмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (40 пмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация свТЗ ниже 1 пмоль/л или выше 40 пмоль/л.

Исследуемая группа	Единицы, пмоль/л	
	Нижний предел	Верхний предел
здоровые доноры	2.5	5.8
Беременные:		
1-й триместр	2.0	3.7
2-й триместр	1.9	3.3
3-й триместр	1.9	3.3

## 11. ЛИТЕРАТУРА

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

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

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

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

*Instruction for use*

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

### **1. INTENDED USE**

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

This kit is designed for measurement of free triiodothyronine in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

### **2. SUMMARY AND EXPLANATION**

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

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

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

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

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

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific rabbit polyclonal to T3-antibodies simultaneously with conjugated fT3-peroxidase. fT3 from the specimen competes with the conjugated fT3 for coating antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

### 4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

**4.1.** For professional use only.

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

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

**4.4.** Avoid contact with stop solution containing 5,0% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.

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

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

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

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

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

**4.10.** Do not mix reagents from different lots.

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

**4.12.** Do not pipette reagents by mouth.

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

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

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

### 5. KIT COMPONENTS

#### 5.1. Contents of the Kit

Symbol	Description	Qty	Units	Colour code	Stability of opened/diluted components
1	FT3 EIA strips, 8x12 wells	1	pcs		until exp. date
2	Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 2.5; 5; 10; 20; 40 pmol/l	6	pcs	bright blue (C1 - colourless)	2 months
3	CONTROL (0.8 ml)	1	pcs	colourless	2 months
4	Conjugate, 5.2 ml	1	pcs	blue	until exp. date
5	Substrate solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
6	Washing solution concentrate 21x, 22 ml	1	pcs	colourless	Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 1 month at 2...+8 °C or 5 days at RT
7	Stop solution, 11 ml	1	pcs	colourless	until exp. date
8	Plate sealing tape	2	pcs		N/A
9	Instruction ft3 EIA	1	pcs		N/A
10	QC data sheet ft3 EIA	1	pcs		N/A

**5.2. Equipment and material required but not provided**

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

**5.3. Storage and stability of the Kit**

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

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

**6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE**

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

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

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

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

**7.2. Procedural Note:**

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

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

**7.3. Assay flowchart**

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

**7.4. Assay procedure**

1	Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 14 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS.
2	Pipet 50 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells.
3	Dispense 50 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit).
4	Incubate 60 minutes at 37 °C.
5	Prepare washing solution by 21x dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 21X) by distilled water. Wash the strips 5 times.
6	Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells
7	Incubate 10–20 minutes at +18...+25 °C
8	Dispense 100 µl of STOP into the wells.
9	Measure OD (optical density) at 450 nm.
10	Set photometer blank on air
11	Apply lin-log method for data reduction.

**7.5. Handling notes**

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

## 8. QUALITY CONTROL

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

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

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

## 9. CALCULATION OF RESULTS

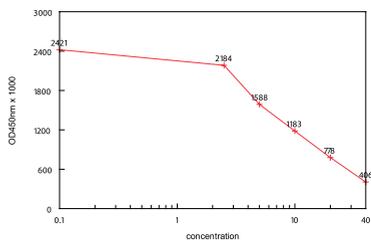
1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

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

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

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

Calibrators	Value	Absorbance Units (450 nm) x 1000
CAL 1	0 pmol/l	2421
CAL 2	2.5 pmol/l	2184
CAL 3	5 pmol/l	1588
CAL 4	10 pmol/l	1183
CAL 5	20 pmol/l	778
CAL 6	40 pmol/l	406



## 10. EXPECTED VALUES

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

Sex, age	Units, pmol/l	
	Lower limit	Upper limit
Healthy donors	2.5	5.8
Pregnancy week:		
1st trimester	2.0	3.7
2nd trimester	1.9	3.3
3rd trimester	1.9	3.3

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

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

### 11.2. Analytical sensitivity

Sensitivity of the assay was assessed as being 1 pmol/l.

### 11.3. Linearity

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

### 11.4. Recovery

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

## 12. LITERATURE

1. Physiology of thyroid hormones. IN: Division of Drugs and Toxicology, American Medical Association: Drug Evaluations Annual 1995. Amer Med Assn, Chicago, 1995, ch 47, pp 1039-1040.

2. Robins J & Rall JE. The Iodine -Containing Hormones. IN Hormones in Blood (2nd ed) 1: 383-490, Gray CH & Bacharach AL (eds) London Academic Press, 1987

