



IVD

CE

# T4-RIA-CT

*KIP1641*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# **History**

---

## **Summary of change:**

|                         |
|-------------------------|
| <b>Current Version:</b> |
| <b>230123</b>           |
| New logo                |



en

Read entire protocol before use.

## T4-RIA-CT

### I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Thyroxine (T4) in serum.

### II. GENERAL INFORMATION

- A. Proprietary name : DIAsource T4-RIA-CT Kit
- B. Catalog number : KIP1641 : 96 tests
- C. Manufactured by : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :  
Tel : +32 (0)10 84.99.11                      Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. CLINICAL BACKGROUND

#### A. Biological activity

L-Thyroxine (T4) is a hormone that is synthesized and stored in the thyroid gland. Proteolytic cleavage of follicular thyroglobulin releases T4 into the bloodstream. Greater than 99% of T4 is reversibly bound to three plasma proteins in blood – thyroxine binding globulin (TGB) binds 70%, thyroxine binding pre-albumin (TBA) binds 20%, and albumin binds 10%. Approximately 0.03% of T4 is in the free, unbound state in blood at any one time.

#### B. Clinical applications

Diseases affecting thyroid function may present a wide array of confusing symptoms. Measurement of total T4 by immunoassay is the most reliable and convenient screening test available to determine the presence of thyroid disorders in patients. Increased levels of T4 have been found in hyper-thyroidism due to Grave's disease and Plummer's disease and in acute and sub acute thyroiditis. Low levels of T4 have been associated with congenital hypothyroidism, myxedema, chronic thyroiditis (Hashimoto's disease) and with some genetic abnormalities.

#### IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of  $^{125}\text{I}$  labelled T4 competes with the T4 to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of anti-T4 antibody sites, which are bound to the goat anti mouse (GAM) antibodies immobilized to the wall of a polystyrene tube. After 1 hour incubation at room temperature, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 2 ml of working wash solution and aspirated again. A calibration curve is plotted and the T4 concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

#### V. REAGENTS PROVIDED

| Reagents   | 96 Tests Kit               | Colour Code | Reconstitution  |
|--|----------------------------|-------------|---|
| Tubes coated with GAM (Goat anti Mouse)  | 2 x 48                     | black       | <b>Ready for use</b>  |
| Ag $^{125}\text{I}$  | 1 vial<br>21 ml<br>111 kBq | red         | <b>Ready for use</b>  |
| TRACER: $^{125}\text{I}$ odine labelled T4 (HPLC grade) in phosphate buffer with bovine casein and azide (<0.1%) |                            |             |   |
| CAL      0   | 1 vial<br>lyophil.         | yellow      | <b>Add 0.5 ml distilled water</b>                                 |
| Zero Calibrator in human serum, gentamycin and thymol  |                            |             |   |
| CAL      N   | 5 vials<br>lyophil.        | yellow      | <b>Add 0.5 ml distilled water</b>                                 |
| Calibrators - N = 1 to 5 (see exact values on vial labels) in human serum, gentamycin and thymol                 |                            |             |   |
| Ab   | 1 vial<br>lyophil.         | blue        | <b>Add 11ml distilled water</b>                                   |
| Anti-T4 (monoclonal) antibodies in phosphate buffer with bovine serum albumin and thymol                         |                            |             |   |
| WASH    SOLN    CONC   | 1 vial<br>10 ml            | brown       | <b>Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).</b> |
| Wash solution (TRIS-HCl)   |                            |             |   |
| CONTROL    N   | 2 vials<br>lyophil.        | silver      | <b>Add 0.5 ml distilled water</b>                                 |
| Controls - N = 1 or 2 in human plasma with thymol  |                            |             |   |

Note : Use the zero calibrator for sera dilutions.

#### VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

1. Distilled water
2. Pipettes for delivery of: 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  and 500  $\mu\text{l}$  (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
3. Vortex mixer
4. Magnetic stirrer
5. Tube shaker
6. 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
7. Aspiration system (optional)
8. Any gamma counter capable of measuring  $^{125}\text{I}$  may be used (minimal yield 70%).

#### VII. REAGENT PREPARATION

- A. **Calibrators:** Reconstitute the calibrators with 0.5 ml distilled water.
- B. **Controls:** Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- C. **Anti-T4:** Reconstitute the anti-T4 with 11 ml distilled water.
- D. **Working Wash solution:** Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

#### VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kits components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, calibrators and controls are stable for 7 days at 2-8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid subsequent freeze-thaw cycles.
- After reconstitution, the anti-T4 antibodies are stable for 6 weeks at 2-8°C. **DO NOT FREEZE.**
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After its first use, tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

#### IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage at -20°C is recommended.
- Avoid subsequent freeze-thaw cycles.

#### X. PROCEDURE

##### A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date.  
Do not mix materials from different kit lots.  
Bring all the reagents to room temperature prior to use.  
Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling.  
Use a clean disposable pipette tip for addition of each different reagent and sample in order to avoid cross-contamination. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision.  
Respect the incubation times.  
Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

##### B. Procedure

1. Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes
2. Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 20  $\mu\text{l}$  of each into the respective tubes.
3. Dispense 200  $\mu\text{l}$  of  $^{125}\text{I}$ odine labelled T4 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
4. Dispense 100  $\mu\text{l}$  of anti-T4 into each tube, except tubes for total counts.
5. Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
6. Incubate for 1 hour at room temperature with continuous shaking.
7. Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
8. Wash tubes with 2 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
9. Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
10. Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

#### XI. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the mean of duplicate determinations.
2. Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$\text{B/B0} (\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

3. Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the T4 concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
4. Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
5. By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the T4 concentrations of the samples from the calibration curve.
6. For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled T4 (B0/T) must be checked.

## XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

| T4          | cpm   | B/Bo (%) |
|-------------|-------|----------|
| Total count | 32598 | B/Bo     |
| Calibrator  |       |          |
| 0 nmol/l    | 12661 | 100.0    |
| 12.8 nmol/l | 11434 | 90.3     |
| 32 nmol/l   | 8460  | 66.8     |
| 80 nmol/l   | 4554  | 36.0     |
| 200 nmol/l  | 2020  | 16.0     |
| 500 nmol/l  | 932   | 7.4      |

## XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

### A. Detection limit

Twenty zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators. The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was < 5 nmol/l.

### B. Specificity

The percentage of cross-reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

| Compound                           | Cross-Reactivity (%) |
|------------------------------------|----------------------|
| L-thyroxine (L-T4)                 | 100                  |
| D-thyroxine (D-T4)                 | 48                   |
| L-3,3',5 - triiodothyronine (L-T3) | 1.01                 |
| L-3,3',5' - triiodothyronine (rT3) | 7                    |

Note: this table shows the cross-reactivity for the anti T4

### C. Precision

#### INTRA-ASSAY PRECISION

#### INTER-ASSAY PRECISION

| Serum | N  | $\text{\langle X \rangle \pm SD (nmol/l)}$ | CV (%) | Serum | N  | $\text{\langle X \rangle \pm SD (nmol/l)}$ | CV (%) |
|-------|----|--|--------|-------|----|--|--------|
| A     | 10 | $32.4 \pm 1.8$                             | 5.6    | A     | 18 | $32.7 \pm 2.1$                             | 6.5    |
| B     | 10 | $183.8 \pm 5.9$                            | 3.2    | B     | 20 | $235.3 \pm 15.2$                           | 6.5    |

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

### D. Accuracy

#### DILUTION TEST

| Sample | Dilution | Theoretical Concent. (nmol/l) | Measured Concent. (nmol/l) |
|--------|----------|-------------------------------|----------------------------|
| A      | 1/1      | -                             | 425                        |
|        | 1/2      | 212.5                         | 194.3                      |
|        | 1/4      | 106.3                         | 89.1                       |
|        | 1/8      | 53.1                          | 48.8                       |
|        | 1/16     | 26.6                          | 22.5                       |

Samples were diluted with zero calibrator.

#### RECOVERY TEST

| Sample | added T4 (nmol/l) | Recovered T4 (nmol/l) | Recovered (%) |
|--------|-------------------|-----------------------|---------------|
| 1      | 32.2              | 27.1                  | 84%           |
|        | 64.4              | 67.8                  | 105%          |
|        | 128.7             | 132.6                 | 103%          |
|        | 257.4             | 290.5                 | 113%          |
|        | 386.1             | 444.8                 | 115%          |

To the best of our knowledge, no international reference material exists for this parameter.

### E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 60 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

#### TIME DELAY

| Serum nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1          | 46.5  | 43.0  | 38.6  | 36.4  |
| C 2          | 202.5 | 212.6 | 207.3 | 201.0 |

## XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

## XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

T4 concentrations for untreated euthyroid subjects (n=298) ranged from 60 to 157 nmol/l. The ranges are expressed as 2.5% to 97.5% percentiles

## XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

### Safety

For *in vitro* diagnostic use only.

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HbsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

## XVII. BIBLIOGRAPHY

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

|   | TOTAL COUNTS<br>µl                                 | CALIBRATORS<br>µl                                      | SAMPLE (S) CONTROLS<br>µl |
|---|--|--|---------------------------|
| Calibrators (0 to 5)                              | -  | 20   | -                         |
| Samples, Controls                                 | -  | -  | 20                        |
| Tracer  | 200  | 200  | 200                       |
| Anti-T4   | -  | 100  | 100                       |
| Incubation  | 1 hour at room temperature with continuous shaking |  |                           |
| Separation<br>Working Wash solution<br>Separation | -  | Aspirate (or decant)<br>2.0 ml<br>Aspirate (or decant) |                           |
| Counting  | Count tubes for 60 seconds                         |  |                           |

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

## T4-RIA-CT

### I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunométrique pour la mesure quantitative *in vitro* de la thyroxine humaine (T4) dans le sérum.

### II. INFORMATIONS GENERALES

- A. Nom du produit : DIAsource T4-RIA-CT kit
- B. Numéro de catalogue: KIP1641 : 96 tests
- C. Fabriqué par : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11                  Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. CONTEXTE CLINIQUE

#### A. Activité biologique

La L-Thyroxine (T4) est une hormone synthétisée et stockée dans la glande thyroïde. Le clivage protéolytique de la thyroglobuline folliculaire relâche la T4 dans la circulation sanguine. Plus de 99% de la T4 sont liés de manière réversible à trois protéines plasmatiques: la globuline de liaison de la thyroxine (TGB) en lie 70%, la pré-albumine de liaison de la thyroxine 20% et l'albumine 10%. Approximativement 0,03% de la T4 se trouve à tout moment dans le sang sous forme libre, non liée.

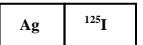
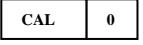
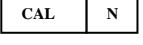
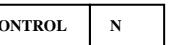
#### B. Applications cliniques

Les maladies affectant la fonction thyroïdienne peuvent présenter une large gamme de symptômes déroutants. La mesure de la T4 totale par dosage radio-immunométrique est le test de dépistage le plus fiable et le plus commode pour déterminer la présence de désordres thyroïdiens chez les patients. On retrouve une augmentation des taux de T4 dans l'hyperthyroïdie due à la maladie de Grave, la maladie de Plummer et dans les thyroïdites aiguës et subaiguës. Des taux de T4 bas sont associés à un hypothyroïdisme congénital, un myxoedème, une thyroïdite chronique (maladie de Hashimoto) et à certaines anomalies génétiques.

#### IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité définie de T4 marquée à l'<sup>125</sup>I entre en compétition avec la T4 à doser présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité définie de sites d'anticorps anti-T4 liés aux anticorps de chèvre anti-souris (CAS) immobilisés sur les parois d'un tube en polystyrène. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 2 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et les concentrations en T4 des échantillons sont déterminées par une interpolation de dose à partir de la courbe de calibration.

#### V. REACTIFS FOURNIS

| Réactifs   | 96 Tests               | Code couleur | Reconstitution  |
|--|------------------------|--------------|---|
| Tubes recouverts avec CAS (chèvre anti-souris)   | 2 x 48                 | Noir         | <b>Prêt à l'emploi</b>  |
|   |                        |              |   |
| TRACEUR: T4 marquée à l' <sup>125</sup> Iode (grade HPLC) dans un tampon phosphate avec de la caséine bovine et de l'azoture (<0.1%) | 1 flacon 21 ml 111 kBq | Rouge        | <b>Prêt à l'emploi</b>  |
|   | 1 flacon lyophilisé    | Jaune        | <b>Ajouter 0,5 ml d'eau distillée</b>   |
| Calibrateur zéro dans du sérum humain, du thymol et de la gentamycine  |                        |              |   |
|   | 5 flacons lyophilisés  | Jaune        | <b>Ajouter 0,5 ml d'eau distillée</b>   |
| Calibrateurs - N = 1 à 5 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain, du thymol et de la gentamycine               |                        |              |   |
|   | 1 flacon lyophilisé    | Bleu         | <b>Ajouter 11 ml d'eau distillée</b>  |
| Anticorps anti-T4 (monoclonal) dans un tampon phosphate avec de la sérum-albumine bovine et du thymol                                |                        |              |   |
|    | 1 flacon 10 ml         | Brun         | <b>Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).</b> |
| Solution de lavage (TRIS-HCl)  |                        |              |   |
|   | 2 flacons lyophilisés  | Gris         | <b>Ajouter 0,5 ml d'eau distillée</b>   |
| Contrôles - N = 1 ou 2 dans le plasma humain avec du thymol  |                        |              |   |

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des sérums

#### VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

1. Eau distillée
2. Pipettes pour distribuer: 20µl, 100µl, 200µl et 500µl (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
3. Agitateur vortex
4. Agitateur magnétique
5. Agitateur de tubes
6. Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
7. Système d'aspiration
8. Tout compteur gamma capable de mesurer l'<sup>125</sup>I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

#### VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. **Calibrateurs** : Reconstituer les calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.
- B. **Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- C. **Anti-T4**: Reconstituer l'anti-T4 avec 11 ml d'eau distillée.
- D. **Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x).

Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

#### VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les calibrateurs et les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquotes devront être réalisées et celles-ci seront gardées à -20°C. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Après reconstitution, les anticorps anti-T4 sont stables pendant 6 semaines à 2-8°C. **NE PAS SURGELER.**
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après la première utilisation, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

#### IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

#### X. MODE OPERATOIRE

##### A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousse de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.  
Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon.  
Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

##### B. Mode opératoire

1. Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, échantillon, contrôle. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
2. Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les échantillons et les contrôles. Puis distribuer 20 µl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
3. Distribuer 200 µl de T4 marquée à l'<sup>125</sup>Iode dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
4. Distribuer 100 µl d'anti-T4 dans chaque tube à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale.
5. Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
6. Incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation continue.
7. Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteint le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
8. Laver les tubes avec 2 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
9. Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
10. Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

#### XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon n)}}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmique" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B<sub>0</sub>(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en T4, écarter les valeurs aberrantes.

4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon ( $B/B_0(\%)$ ) détermine les concentrations en T4 à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de T4 non marquée ( $B_0/T$ ) doit être vérifié.

## XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

| T4-RIA-CT       |             | cpm   | B/Bo (%) |
|-----------------|-------------|-------|----------|
| Activité totale |             | 32598 | B/Bo     |
| Calibrateur     | 0 nmol/l    | 12661 | 100,0    |
|                 | 12,8 nmol/l | 11434 | 90,3     |
|                 | 32 nmol/l   | 8460  | 66,8     |
|                 | 80 nmol/l   | 4554  | 36,0     |
|                 | 200 nmol/l  | 2020  | 16,0     |
|                 | 500 nmol/l  | 932   | 7,4      |

## XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

### A. Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de < 5 nmol/l.

### B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

| Composé                            | Réactivité Croisée (%) |
|------------------------------------|------------------------|
| L-thyroxine (L-T4)                 | 100                    |
| D-thyroxine (D-T4)                 | 48                     |
| L-3,3',5 - triiodothyronine (L-T3) | 1,01                   |
| L-3,3',5' – triiodothyronine (rT3) | 7                      |

Note: cette table montre la réactivité croisée pour l'anti-T4

### C. Précision

#### INTRA-ESSAI

#### INTER-ESSAI

| Sérum | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) | Sérum | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) |
|-------|----|---------------------------|--------|-------|----|---------------------------|--------|
| A     | 10 | $32,4 \pm 1,8$            | 5,6    | A     | 18 | $32,7 \pm 2,1$            | 6,5    |
| B     | 10 | $183,8 \pm 5,9$           | 3,2    | B     | 20 | $235,3 \pm 15,2$          | 6,5    |

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

## D. Exactitude

### TEST DE DILUTION

| Echantillon | Dilution | Concent. Théorique (nmol/l) | Concent. Mesurée (nmol/l) |
|-------------|----------|-----------------------------|---------------------------|
| A           | 1/1      | -                           |                           |
|             | 1/2      | 212,5                       | 425                       |
|             | 1/4      | 106,3                       | 194,3                     |
|             | 1/8      | 53,1                        | 89,1                      |
|             | 1/16     | 26,6                        | 48,8                      |
|             |          |                             | 22,5                      |

Les échantillons ont été dilués avec le Calibrateur zéro.

### TEST DE RECUPERATION

| Echantillon | T4 ajoutée (nmol/l) | T4 récupérée (nmol/l) | Récupération (%) |
|-------------|---------------------|-----------------------|------------------|
| 1           | 32,2                | 27,1                  | 84%              |
|             | 64,4                | 67,8                  | 105%             |
|             | 128,7               | 132,6                 | 103%             |
|             | 257,4               | 290,5                 | 113%             |
|             | 386,1               | 444,8                 | 115%             |

A notre connaissance, aucun matériel de référence internationale n'existe pour ce paramètre.

### E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 60 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

### DELAI

| Sérum nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1          | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2          | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

## XIV. CONTRÔLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôles, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicate des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

## XV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

La fourchette des concentrations en T4 pour des sujets euthyroïdiens non traités (n=298) est de 60 à 157 nmol/l. Les fourchettes représentent les centiles 2.5% à 97.5%.

## XVI. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

### Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de l'<sup>125</sup>I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et  $\gamma$  (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate.

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité. Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azoture de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azoture de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azoture dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

## XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

|  | ACTIVITE TOTALE ( $\mu$ l)                              | CALIBRATEURS ( $\mu$ l)  | ECHANTILLON(S) CONTROLES ( $\mu$ l) |
|--|---|--|-------------------------------------|
| Calibrateurs (0 à 5)<br>Echantillons,<br>contrôles<br>Traceur<br>Anti-T4 | -<br>-<br>200<br>-                                      | 20<br>-<br>200<br>100  | -<br>20<br>200<br>100               |
| Incubation   | 1 heure à température ambiante sous agitation continue. |  |                                     |
| Séparation<br>Solution de Lavage<br>Séparation                           | -   | Aspiration (ou décantage)<br>2,0 ml<br>Aspiration (ou décantage) |                                     |
| Comptage<br>(radioactivité)  | Temps de comptage des tubes : 60 secondes               |  |                                     |



de

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

## T4-RIA-CT

### I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Thyroxin (T4) in Serum.

### II. ALLGEMEINE INFORMATION

A. Handelsbezeichnung : DIAsource T4-RIA-CT Kit

B. Katalognummer : KIP1641 : 96 Tests

C. Hergestellt von : DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11                      Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. KLINISCHER HINTERGRUND

#### A. Biologische Aktivität

L-Thyroxin (T4) ist ein Hormon, das in der Schilddrüse synthetisiert und gespeichert wird. Die proteolytische Aufspaltung von follikulärem Thyroglobulin setzt T4 in den Blutkreislauf frei. Mehr als 99% des T4 ist reversibel an die 3 Plasmaproteine im Blut gebunden- Thyroxin bindendes Globulin (TGB) bindet 70%, Thyroxin bindendes Präalbumin (TBA) bindet 20 % und Albumin bindet 10%. Ungefähr 0,03% des T4 befinden sich zu jeder Zeit frei und ungebunden im Blut.

#### B. Klinische Anwendungen

Krankheiten, die die Schilddrüsenfunktion beeinflussen können einen weiten Bereich verwirrender Symptome hervorrufen. Die Messung von Gesamt T4 im Immunassay ist der am besten verlässliche und geeignete Screeningtest, um das Vorhandensein von Schilddrüsenstörungen bei Patienten festzustellen. Erhöhte Spiegel von T4 wurden bei Schilddrüsenüberfunktion infolge von Grave's Erkrankung, Plummer's Erkrankung und bei akuter und weniger akuter Thyroiditis gefunden. Niedrige Spiegel von T4 wurden mit angeborener Schilddrüsenunterfunktion, Myxödem , chronischer Thyroiditis (Hashimoto's Syndrom) und mit einigen genetischen Abnormitäten verknüpft.

#### IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine bestimmte Menge an  $^{125}\text{I}$  markiertem T4 konkurriert mit dem zu messenden T4 der Probe oder des Kalibrators um die festgelegte Menge an Anti-T4 Antikörperbindungsstellen des Ziege Anti-Maus Antikörpers, der an die Wand der Polystyrolröhre gebunden ist. Nach 1 Stunde Inkubation bei Raumtemperatur, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit 2 ml Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Standardkurve wird gedruckt und die T4-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

#### V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

| Reagenz   | 96 Test Kit                 | Farocode | Rekonstitution  |
|---|-----------------------------|----------|---|
| Mit GAM (Ziege Anti-Maus) beschichtete Röhrchen   | 2 x 48                      | Schwarz  | gebrauchsfertig   |
| Ag $^{125}\text{I}$<br>TRACER: $^{125}\text{I}$ -markiertes T4 (HPLC grade) in Phosphatpuffer mit Rindercasein und Azid (<0,1%) | 1 Gefäß<br>21 ml<br>111 kBq | Rot      | gebrauchsfertig   |
| CAL 0<br>Null-Kalibrator: Humanserum, Gentamycin und Thymol   | 1 Gefäß lyophilisiert       | Gelb     | 0,5 ml destilliertem Wasser zugeben                             |
| CAL N<br>Kalibratoren - N = 1 bis 5 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum, Gentamycin und Thymol                     | 5 Gefäße lyophilisiert      | Gelb     | 0,5 ml destilliertem Wasser zugeben                             |
| Ab<br>Anti-T4 Antikörper (monoklonal) in Phosphatpuffer mit Rinderserumalbumin und Thymol                                       | 1 Gefäß lyophilisiert.      | Blau     | 11 ml dest. Wasser zugeben                                      |
| WASH SOLN CONC<br>Waschlösung (TRIS-HCl)  | 1 Gefäß 10 ml               | Braun    | 70x mit destilliertem Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen |
| CONTROL N<br>Kontrollen - N = 1 oder 2 in Humanplasma mit Thymol  | 2 vials lyophilisiert       | Silber   | 0,5 ml destilliertem Wasser zugeben                             |

Achtung: Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Serumverdünnung

#### VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  und 500  $\mu\text{l}$  (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- Vortexmixer
- Magnetrührer
- RöhrchenSchüttler
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Jeder Gamma-Counter, der  $^{125}\text{I}$  messen kann, kann verwendet werden. (minimale Ausbeute 70%)

#### VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Kalibratoren:** Rekonstituieren Sie die Kalibratoren mit 0,5 ml destilliertem Wasser.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml destilliertem Wasser.
- Anti-T4:** Rekonstituieren Sie das Anti T3 mit 11 ml destilliertem Wasser.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

#### VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind die Kalibratoren und Kontrollen eine Woche bei 2 bis 8°C stabil. Für eine längere Aufbewahrung sollten diese Reagenzien aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden während max. 3 Monaten. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Nach der Rekonstituierung sind die Anti T4 Antikörper für 6 Wochen bei 2-8°C stabil. NICHT EINFRIEREN.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Wenn der Tracer nach der ersten Benutzung wieder im gut verschlossenen Originalgefäß bei 2 bis 8°C aufbewahrt wird, ist er bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

#### IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8°C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

#### DURCHFÜHRUNG

##### A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Verfallsdatum.  
Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

##### B. Durchführung

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Probe. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie 20  $\mu\text{l}$  von jedem in ihre Röhrchen.
- Geben Sie 200  $\mu\text{l}$  des  $^{125}\text{I}$ -markierten T4 in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Dispensieren Sie 100  $\mu\text{l}$  Anti T4 in jedes Röhrchen mit Ausnahme der Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie 1 Stunde bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (oder dekantieren Sie) (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 2 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab (oder dekantieren Sie). Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

#### XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
$$\text{B/B0} (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$
- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen), tragen Sie die (B/B0(%))-Werte für jeden Kalibratorpunkt ein als Funktion der T4 Konzentration für jeden Kalibratorpunkt. Schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit

dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer, 4 Parameter-Kurvenfunktion.

5. Bestimmen Sie die T4 Konzentrationen der Proben durch Interpolation der Probenwerte (B/B0(%)) aus der Referenzkurve.
6. Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes T4 (B0/T) geprüft werden

## XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationskurve verwendet werden.

| T4              | cpm   | B/Bo (%) |
|-----------------|-------|----------|
| Gesamtaktivität | 32598 | B/Bo     |
| Kalibrator      |       |          |
| 0 nmol/l        | 12661 | 100,0    |
| 12,8 nmol/l     | 11434 | 90,3     |
| 32 nmol/l       | 8460  | 66,8     |
| 80 nmol/l       | 4554  | 36,0     |
| 200 nmol/l      | 2020  | 16,0     |
| 500 nmol/l      | 932   | 7,4      |

## XII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

### A. Nachweisgrenze

Zwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach < 5 nmol/l.

### B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

| Substanz                        | Kreuzreakтивität (%) |
|---------------------------------|----------------------|
| L-Thyroxin (L-T4)               | 100                  |
| D-Thyroxin (D-T4)               | 48                   |
| L-3,3',5-Trijodothyronin (L-T3) | 1,01                 |
| 3,3',5'-Trijodthyronin (rT3)    | 7                    |

**Bemerkung:** Diese Tabelle zeigt die Kreuzreaktivität für die anti T4

### C. Präzision

#### INTRA-ASSAY PRÄZISION

#### INTER-ASSAY PRÄZISION

| Serum | N  | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (nmol/l) | CV (%) | Serum | N  | $\text{\bar{x}} \pm \text{SD}$ (nmol/l) | CV (%) |
|-------|----|---|--------|-------|----|---|--------|
| A     | 10 | $32,4 \pm 1,8$                          | 5,6    | A     | 18 | $32,7 \pm 2,1$                          | 6,5    |
| B     | 10 | $183,8 \pm 5,9$                         | 3,2    | B     | 20 | $235,3 \pm 15,2$                        | 6,5    |

SD: Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

### D. Genauigkeit

#### VERDÜNNUNGSTEST

| Probe | Verdünnung | Theoretische Konzent. (nmol/l) | Gemessene Konzent. (nmol/l) |
|-------|------------|--------------------------------|-----------------------------|
| A     | 1/1        | -                              | 425                         |
|       | 1/2        | 212,5                          | 194,3                       |
|       | 1/4        | 106,3                          | 89,1                        |
|       | 1/8        | 53,1                           | 48,8                        |
|       | 1/16       | 26,6                           | 22,5                        |

Die Proben wurden mit Null-Kalibrator verdünnt.

## WIEDERFINDUNGSTEST

| Probe | Zugeg. T4 (nmol/l) | Wiedergef. T4 (nmol/l) | Wiedergefunden (%) |
|-------|--------------------|------------------------|--------------------|
| 1     | 32,2               | 27,1                   | 84%                |
|       | 64,4               | 67,8                   | 105%               |
|       | 128,7              | 132,6                  | 103%               |
|       | 257,4              | 290,5                  | 113%               |
|       | 386,1              | 444,8                  | 115%               |

Laut unserem Wissen, gibt es keine internationale Referenzen zu diesen Parametern.

### E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im Folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann gewährleistet ist, wenn die Probe 60 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugegeben wird.

## ZEITDIFFERENZ

| Serum nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1          | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2          | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

## XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können diese Werte, ohne treffende Erklärung für die Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls zusätzliche Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

## XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

Die T4 Konzentrationen für unbehandelte euthyroide Personen (n=298) liegen zwischen 60 bis 157 nmol/L. Das Spektrum wird von 2,5% bis 97,5% dargestellt.

## XVI. VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

### Sicherheit

Nur für *in vitro* diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält  $^{125}\text{I}$  (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und  $\gamma$  (35,5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in den USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV-1 und -2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit darüber liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien oder Serumproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschritte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und ver wenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

#### XVII. LITERATUR

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

#### XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

|   | GESAMT-AKTIVITÄT<br>(µl)                                | KALIBRATOREN<br>(µl)   | PROBE(N)-KONTROLLEN<br>(µl) |
|---|---|--|-----------------------------|
| Kalibratoren (0 to 5)                   | -   | 20   | -                           |
| Proben, Kontrollen                      | -   | -  | 20                          |
| Tracer                                  | 200   | 200  | 200                         |
| Anti-T4                                 | -   | 100  | 100                         |
| Inkubation                              | 1 Stunde bei Raumtemperatur unter permanentem Schütteln |  |                             |
| Separation<br>Waschlösung<br>Separation | -   | Absaugen (oder dekantieren)<br>2,0 ml<br>Absaugen (oder dekantieren) |                             |
| Auswertung                              | Messen der Röhrchen 60 Sekunden                         |  |                             |



it

Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

## T4-RIA-CT

### I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro della Tiroxina umana (T4) in siero.

### II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. **Nome commerciale:** DIAsource T3-RIA-CT Kit  
B. **Numero di catalogo:** KIP1641: 96 test  
C. **Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:  
Tel: +32 (0)10 84.99.11      Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMAZIONI CLINICHE

#### A. Attività biologiche

La L-Tiroxina (T4) è un ormone che viene prodotto e immagazzinato nella ghiandola tiroidea. Il clivaggio proteolitico della tireoglobulina follicolare libera T4 nel flusso sanguigno. Nel sangue, più del 99% di T4 si trova reversibilmente legato a tre plasmaproteine – la globulina legante la tiroxina (TBG) per il 70%, la prealbumina legante la tiroxina (TBA) per il 20% e l'albumina per il 10%. In circolo, la T4 si trova in forma libera non legata approssimativamente in una percentuale dello 0,03%.

#### B. Applicazioni cliniche

Le patologie a carico della ghiandola tiroidea sono accompagnate da una sintomatologia variegata e poco chiara. La determinazione dei livelli di T4 totale mediante immunodosaggio costituisce attualmente il più attendibile e comodo test di screening disponibile per individuare la presenza di eventuali disordini tiroidei. Un aumento dei livelli di T4 è riscontrabile in casi di ipertiroidismo causato da morbo di Graves e morbo di Plummer e di tiroidite acuta e subacuta. Livelli ridotti di T4 risultano invece associati con ipotiroidismo congenito, mixedema, tiroidite cronica (tiroidite di Hashimoto) e con alcune alterazioni genetiche.

#### IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità fissa di T4 marcato con  $^{125}\text{I}$  compete con il T4 da quantificare presente nel campione o nel calibratore, per una quantità fissa di siti anticorpali anti-T4 legati ad anticorpi di capra anti-topo (GAM) adesi alla parete di provette di polistirene. Dopo un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente, la fase di aspirazione pone termine alla reazione di competizione. Le provette vengono quindi lavate con 2 ml di soluzione di lavaggio e nuovamente aspirate. Viene quindi tracciata la curva di calibrazione, da cui per interpolazione si ottengono i valori di concentrazione di T4 nei campioni.

#### V. REATTIVI FORNITI

| Reattivi   | Kit da 96 test          | Codice colore | Volume di ricostituzione  |
|--|-------------------------|---------------|---|
| Provette sensibilizzate con GAM (capra anti-topo)  | 2 x 48                  | nero          | Pronte per l'uso  |
| Ag $^{125}\text{I}$  | 1 flacone 21 ml 111 kBq | rosso         | Pronte per l'uso  |
| Marcato: T4 marcato con $^{125}\text{I}$ (grado HPLC), in tampone fosfato con caseina bovina e sodio azide (<0,1%) |                         |               |   |
| CAL 0  | 1 flacone Liofiliz.     | giallo        | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| Calibratore Zero in siero umano, gentamicina e timolo  |                         |               |   |
| CAL N  | 5 flaconi Liofiliz.     | giallo        | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| Calibratori N. 1-5 (vedi valori esatti sulle etichette dei flaconi) in siero umano, gentamicina e timolo           |                         |               |   |
| Ab   | 1 flacone Liofiliz.     | blu           | Aggiungere 11 ml di acqua distillata                            |
| Anticorpi anti-T4 (monoclonali) in tampone fosfato con albumina di siero bovino e timolo                           |                         |               |   |
| WASH SOLN CONC   | 1 flacone 10 ml         | bruno         | Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico |
| Wash solution (TRIS-HCl)   |                         |               |   |
| CONTROL N  | 2 flaconi Liofiliz.     | argento       | Aggiungere 0,5 ml di acqua distillata                           |
| Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano con timolo   |                         |               |   |

**Nota :** Per la diluizione, utilizzare il calibratore Zero.

#### VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

- Acqua distillata.
- Pipette per dispensare 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  e 500  $\mu\text{l}$  (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
- Agitatore tipo vortex.
- Agitatore magnetico.
- Agitatore rotante (700rpm)
- Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi. (Tipo Cornwell)
- Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
- Contatore gamma con finestra per  $^{125}\text{I}$  (efficienza minima 70%)

#### VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- Calibratore:** Ricostituire i calibratori con 0,5 ml di acqua distillata.
- Controlli:** Ricostituire i controlli con 0,5 ml di acqua distillata.
- Anti-T4:** Ricostituire l'anti-T4 con 11 ml di acqua distillata.
- Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio:** Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

#### VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo recostituzione, calibratore e controlli sono stabili 7 giorni a 2-8°C e suddivisi in aliquote a -20°C per periodi più lunghi per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento.
- Dopo recostituzione, gli anticorpi anti-T4 rimangono stabili per 6 settimane a 2-8°C. **NON CONGELARE.**
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo apertura del flacone, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

#### IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelamento dei campioni.

#### X. METODO DEL DOSAGGIO

##### A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente.  
Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usa un nuovo reattivo o campione.  
L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione.  
Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

##### C. Metodo del dosaggio

- Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplice ogni calibratore, campione o controllo. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
- Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 20  $\mu\text{l}$  di calibratore, campioni e controlli nelle rispettive provette.
- Dispensare 200  $\mu\text{l}$  di T4 marcato con  $^{125}\text{I}$  in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
- Distribuire 100  $\mu\text{l}$  di anti-T4 in ogni provetta, escluse quelle per l'attività totale
- Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
- Incubare per un'ora a temperatura ambiente su agitatore.
- Aspirare (o decantare) il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
- Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 2 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
- Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
- Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

#### XI. CALCOLO DEI RISULTATI

- Calcolare la media delle determinazioni in duplice.
- Calcolare la radiattività legata come percentuale di legame determinata al punto di calibrazione zero (0) secondo la seguente formula:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

- Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di T4, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
- È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di T4.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

## XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di T4 in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

| T4              | cpm   | B/Bo (%) |
|-----------------|-------|----------|
| Attività totale | 32598 | B/BO     |
| Calibratore     |       |          |
| 0 nmol/l        | 12661 | 100,0    |
| 12,8 nmol/l     | 11434 | 90,3     |
| 32 nmol/l       | 8460  | 66,8     |
| 80 nmol/l       | 4554  | 36,0     |
| 200 nmol/l      | 2020  | 16,0     |
| 500 nmol/l      | 932   | 7,4      |

## XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

### A. Sensibilità

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere < 5 nmol/l.

### B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

| Composto                           | Cross-Reattività (%) |
|------------------------------------|----------------------|
| L-thyroxine (L-T4)                 | 100                  |
| D-thyroxine (D-T4)                 | 48                   |
| L-3,3',5 - triiodothyronine (L-T3) | 1,01                 |
| L-3,3',5' - triiodothyronine (rT3) | 7                    |

Nota : questa tabella mostra la cross-reattività relativa all'anti T4.

### C. Precisione

#### INTRA SAGGIO                            INTER SAGGIO

| Siero | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/L) | CV (%) | Siero | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/L) | CV (%) |
|-------|----|---------------------------|--------|-------|----|---------------------------|--------|
| A     | 10 | 32,4 ± 1,8                | 5,6    | A     | 10 | 32,7 ± 2,1                | 6,5    |
| B     | 10 | 183,8 ± 5,9               | 3,2    | B     | 10 | 235,3 ± 15,2              | 6,5    |

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

### D. Accuratezza

#### TEST DI DILUIZIONE

| Campione | Diluizione | Concentrazione teorica (nmol/L) | Concentrazione misurata (ng/ml) |
|----------|------------|---------------------------------|---------------------------------|
| A        | 1/1        | -                               | 425                             |
|          | 1/2        | 212,5                           | 194,3                           |
|          | 1/4        | 106,3                           | 89,1                            |
|          | 1/8        | 53,1                            | 48,8                            |
|          | 1/16       | 26,6                            | 22,5                            |

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

#### TEST DI RECUPERO

| Campione | T4 aggiunto (nmol/L) | T4 recuperato (nmol/L) | Recupero (%) |
|----------|----------------------|------------------------|--------------|
| 1        | 32,2                 | 27,1                   | 84%          |
|          | 64,4                 | 67,8                   | 105%         |
|          | 128,7                | 132,6                  | 103%         |
|          | 257,4                | 290,5                  | 113%         |
|          | 386,1                | 444,8                  | 115%         |

A quanto risulta, non esiste alcun riferimento internazionale per tale parametro.

#### E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 60 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

| TEMPO TRASCORSO |       |       |       |       |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| Siero nmol/l    | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
| C 1             | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2             | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

## XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

## XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

Le concentrazioni di T4 in soggetti eutiroidei non trattati (n=298) variavano da 60 a 157 nmol/l. I range sono espressi come percentili da 2,5% a 97,5%.

## XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

### Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene  $^{125}\text{I}$  (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali.

Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni.

In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti.

Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni.

Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi.

Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

## XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. DAUGHADAY W.H. and ROTWEIN P. (1989)  
**Insulin-like growth factors I and II. peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentrations.**  
Endocrine Rev., 10(1) : 68-91.
2. FROESCH E.R. and ZAPF J. (1985)  
**Insulin-like growth factors and insulin : comparative aspects.**  
Diabetologia, 28 : 485-493.
3. FURLANETTO R.W., UNDERWOOD L., VAN WYK J.J., D'ERCOLE A.J. (1977)  
**Estimation of somatomedin-C levels in normals and patients with pituitary disease by radioimmunoassay.**  
J. Clin. Invest. 60 : 648.
4. ROSENFIELD R.G., WILSON D.M., LEE P.D.K. and HINTZ R.L. (1986)  
**Insulin-like growth factors I and II in evaluation of growth retardation.**  
J. Pediatr., 109 : 428.
5. RUDMAN D., KUTNER M.H. and CHAWLA R.K. (1985)  
**The short child with subnormal plasma somatomedin-C.**  
Pediatric Res., 19(10) : 975-980.
6. ALBERTSSON-WIKLAND K. and HALL K. (1987)  
**Growth hormone treatment in short children : relationship between growth and serum insulin-like growth factor I and II levels.**  
J. Clin. Endocrinol Metab., 65 : 671.
7. WASS J.A.H., CLEMMONS D.R., UNDERWOOD L.E., BARROW L., BESSER G.M. and VAN WYK J.J. (1982)  
**Changes in circulating somatomedin-C levels in bromocriptine treated acromegaly.**  
Clin. Endocrinol., 77 : 369-377.
8. DAUGHADAY W.H., MARIZ I.K. and BLETHEN S.L. (1980)  
**Inhibition of access of bound somatomedin to membrane receptor and immunobinding sites - a comparison of radioreceptor and radioimmunoassay of somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum.**  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 51 : 781.
9. BREIERB.H., GALLAHER B.W. and GLUCKMAN P.D. (1991)  
**Radioimmunoassay for insulin-like growth factor-I : solutions to some potential problems and pitfalls.**  
Journal of Endocrinology, 128 : 347-357.
10. SCHOUTEN J.S.A.G. and al. (1993)  
**IGF1 : a prognostic factor of knee osteoarthritis.**  
British J. Rheumatol., 32 : 274-280.
11. GRONBAEK H., SKJAERBAEK C., NIELSEN B., FRYSTYK J., FOEGH M.L., FLYVBJERG A., ORSKOV H. (1995)  
**Growth hormone and insulin-like growth factor-I: a suggested role in renal transplantation and graft vessel disease.**  
Transplant. Proceed., 27/3 : 2133-2136.
12. TSITOURAS P.D., ZHONG Y.G., SPUNGEN A.M., BAUMAN W.A. (1995)  
**Serum testosterone and growth hormone insulin-like growth factor-I in adults with spinal cord injury.**  
Hormone and metabolic Research , 27/6 : 287-292.
13. KOCH A., DORR H.G., GERLING S., BEHRENS R., BOHLES H.J. (1995)  
**Effect of growth hormone on IDF-I levels in patients with growth hormone deficiency and Wilson disease.**  
Hormone Research, 44/1 : 40-44.

## XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

|   | Attività totale $\mu\text{l}$                 | Calibratore $\mu\text{l}$ | Campioni Controlli $\mu\text{l}$ |
|---|---|---------------------------|----------------------------------|
| Calibratore (0-5)                           | -   | 20                        | -                                |
| Campioni, Controlli                         | -   | -                         | 20                               |
| Marcato                                     | 200   | 200                       | 200                              |
| Anti T4                                     | -   | 100                       | 100                              |
| Incubazione                                 | 60 minuti a temperatura ambiente su agitatore |                           |                                  |
| Separazione                                 |   | Aspirare (o decantare)    |                                  |
| Soluzione di lavoro del tamponi di lavaggio |   | 2,0 ml                    |                                  |
| Separazione                                 |   | Aspirare (o decantare)    |                                  |
| Conteggio                                   | Contare le provette per 1 minuto              |                           |                                  |



es

Leer el protocolo completo antes de usar.

## T4-RIA-CT

### I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de tiroxina (T4) humana en suero.

### II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre:** DIAsource T4-RIA-CT Kit
- B. **Número de Catálogo:** KIP1641 : 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas e información sobre pedidos contactar :

Tel : +32 (0)10 84.99.11                  Fax : +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMACIÓN CLÍNICA

#### A. Actividad biológica

La L-tiroxina (T4) es una hormona sintetizada y almacenada en la glándula tiroides. El corte proteolítico de la tiroglobulina folicular libera T4 al torrente sanguíneo. Más del 99% de T4 se une reversiblemente a tres proteínas plasmáticas de la sangre, la globulina de unión a tiroxina (TBG) une el 70%, la prealbúmina de unión a tiroxina (TBA) une el 20%, y la albúmina une el 10%. Aproximadamente el 0,03% de la T4 está en forma libre, sin estar unida a ninguna proteína de la sangre en ningún momento.

#### B. Aplicaciones clínicas

Las enfermedades que afectan a la función tiroidea pueden presentar una gran variedad de síntomas confusos. La medición de T4 total mediante inmunoensayo es el método de diagnóstico precoz más fiable y práctico disponible para determinar la presencia de trastornos tiroideos en los pacientes. En casos de hipertiroidismo provocados por la enfermedad de Grave o por la enfermedad de Plummer y en tiroiditis agudas y subagudas se han detectado mayores niveles de T4. Los bajos niveles de T4 están asociados con hipotiroidismo congénito, mixedema, tiroiditis crónica (enfermedad de Hashimoto) y con algunas anomalías genéticas.

#### IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de T4 marcada con  $I^{125}$  compite con el T4 a medir, presente en la muestra o en el calibrador, para una cantidad fija de sitios de anticuerpo anti-T4, que se unen a los anticuerpos de cabra anti-ratón (GAM), inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 2 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de T4 de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración.

#### V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

| Reactivos  | Kit 96 pruebas             | Código de Color | Reconstitución  |
|--|----------------------------|-----------------|---|
| Tubos recubiertos con GAM (cabra anti- ratón)  | 2 x 48                     | negro           | <b>Listo para uso</b>   |
|    | 1 vial<br>21 ml<br>111 kBq | rojo            | <b>Listo para uso</b>   |
| TRAZADOR: T4 marcado con $I^{125}$ (grado HPLC) en tampón fosfato con caseína bovina y azida (<0,1%)   |                            |                 |   |
|    | 1 vial<br>liofilizados     | amarillo        | <b>Añadir</b> 0,5 ml de agua destilada                              |
| Calibrador cero en suero humano con gentamicina y timol  |                            |                 |   |
|    | 5 viales<br>liofilizados   | amarillo        | <b>Añadir</b> 0,5 ml de agua destilada                              |
| Calibradores - N = 1 al 5 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano con gentamicina y timol   |                            |                 |   |
|    | 1 vial<br>liofilizado      | azul            | <b>Añadir</b> 11 ml de agua destilada                               |
| Anticuerpos anti-T4 (monoclonales) en tampón fosfato con albúmina de suero bovino y timol  |                            |                 |   |
|    | 1 vial<br>10 ml            | marrón          | <b>Diluir</b> 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético) |
| Solución de lavado ( TRIS-HCl)   |                            |                 |   |
|    | 2 viales<br>liofilizados   | plateado        | <b>Añadir</b> 0,5 ml de agua destilada                              |
| Controles - N = 1 ó 2 en plasma humano con timol   |                            |                 |   |

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

#### VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 20  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l y 500  $\mu$ l (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Agitador de tubos
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir  $I^{125}$  (mínima eficiencia 70%)

#### VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Calibradores:** Reconstituir los calibradores con 0,5 ml de agua destilada.
- B. **Controles:** Reconstituir los controles con 0,5 ml de agua destilada.
- C. **Anti-T4:** Reconstituir el anti-T4 con 11 ml de agua destilada.
- D. **Solución de lavado de trabajo:** Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para

homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

#### VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir o reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8 °C.
- Despues de su reconstitución los calibradores y controles son estables durante una semana a 2-8 °C. Para períodos más largos, alicuotar y guardar a -20 °C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Despues de la reconstitución, los anticuerpos anti-T4 son estables durante 6 semanas a 2-8 °C. **NO CONGELAR.**
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día.
- Despues del primer uso, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8 °C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad o deterioro.

#### IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8 °C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

#### X. PROTOCOLO

##### A. Notas de manejo

No utilizar el kit o componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar ninguna contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión o equipamiento de dispensación automática mejorará la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

##### B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada uno de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 20  $\mu$ l de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 200  $\mu$ l de T4 marcado con  $I^{125}$  en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
4. Dispensar 100  $\mu$ l de anti-T4 en cada tubo, salvo en los tubos de recuento total.
5. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva de las paredes de los tubos.
6. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua.
6. Aspirar (o decantar) el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 2 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar (o decantar). Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

#### XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrado r ó muestra)}}{\text{Cuentas ( Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico o logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las contracciones del T4 de cada calibrador, rechazando los extremos claros.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un

sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “4 parámetros”.

5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones del T4 de las mismas desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de T4 no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

## XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

| T4              | cpm   | B/B0 (%) |
|-----------------|-------|----------|
| Cuentas Totales | 32598 | B/B0     |
| Calibrador      |       |          |
| 0 nmol/l        | 12661 | 100,0    |
| 12,8 nmol/l     | 11434 | 90,3     |
| 32 nmol/l       | 8460  | 66,8     |
| 80 nmol/l       | 4554  | 36,0     |
| 200 nmol/l      | 2020  | 16,0     |
| 500 nmol/l      | 932   | 7,4      |

## XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

### A. Límite de detección

Veinte calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores.

El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue < 5 nmol/l.

### B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada por la comparación de la concentración (indicando una inhibición de 50 %) es respectivamente :

| Componente                        | Reacción-cruzada (%) |
|-----------------------------------|----------------------|
| L-tiroxina (L-T4)                 | 100                  |
| D-tiroxina (D-T4)                 | 48                   |
| L-3,3',5 - triyodotironina (L-T3) | 1,01                 |
| 3,3',5' - triyodotironina (rT3)   | 7                    |

**Nota:** Esta tabla presenta la reacción cruzada para el anti T4

### C. Precisión

#### PRECISION INTRA-ENSAYO

| Suero | N  | $\text{\langle X \rangle \pm SD (nmol/l)}$ | CV (%) | Suero | N  | $\text{\langle X \rangle \pm SD (nmol/l)}$ | CV (%) |
|-------|----|--|--------|-------|----|--|--------|
| A     | 10 | $32,4 \pm 1,8$                             | 5,6    | A     | 18 | $32,7 \pm 2,1$                             | 6,5    |
| B     | 10 | $183,8 \pm 5,9$                            | 3,2    | B     | 20 | $235,3 \pm 15,2$                           | 6,5    |

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

### D. Exactitud

#### PRUEBA DE DILUCIÓN

| Muestra | Dilución | Concent. Teórica (nmol/l) | Concent. Medida (μg/dl) |
|---------|----------|---------------------------|-------------------------|
| A       | 1/1      | -                         | 425                     |
|         | 1/2      | 212,5                     | 194,3                   |
|         | 1/4      | 106,3                     | 89,1                    |
|         | 1/8      | 53,1                      | 48,8                    |
|         | 1/16     | 26,6                      | 22,5                    |

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero.

## PRUEBA DE RECUPERACIÓN

| Muestra | T4 añadido (nmol/l) | T4 Recuperado (nmol/l) | Recuperado (%) |
|---------|---------------------|------------------------|----------------|
| 1       | 32,2                | 27,1                   | 84%            |
|         | 64,4                | 67,8                   | 105%           |
|         | 128,7               | 132,6                  | 103%           |
|         | 257,4               | 290,5                  | 113%           |
|         | 386,1               | 444,8                  | 115%           |

De acuerdo con nuestros conocimientos, no existe ninguna preparación de referencia internacional de este parámetro.

### E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 60 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

#### TIEMPO DE ESPERA

| Suero (nmol/l) | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1            | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2            | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

## XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

## XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

Las concentraciones de T4 en sujetos eutiroideos sin tratar oscilan entre 60 a 157 nmol/l (n=298).

Alcance basados en percentilos de 2,5% & 97,5%

## XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

### Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene I<sup>125</sup> (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35,5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en una área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido analizados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido

informado. Sin embargo, los componentes que contengan substancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer o utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetejar con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

|                               | RECUENTOS<br>TOTALES<br>(μl)                         | CALIBRADO<br>RES<br>(μl)       | MUESTRA(S)<br>CONTROL(S)<br>(μl) |
|-------------------------------|--|--------------------------------|----------------------------------|
| Calibradores (0 al 5)         | -  | 20                             | -                                |
| Muestras, controles           | -  | -                              | 20                               |
| Trazador                      | 200  | 200                            | 200                              |
| Anti-T4                       | -  | 100                            | 100                              |
| Incubación                    | 1 hora a temperatura ambiente con agitación continua |                                |                                  |
| Separación                    | -  | Aspirar (o decantar)<br>2,0 ml |                                  |
| Solución de lavado de trabajo | -  | Aspirar (o decantar)           |                                  |
| Separación                    | -  |                                |                                  |
| Recuento                      | Contar los tubos durante 60 segundos                 |                                |                                  |

CE

el

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

## T4-RIA-CT

### I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την *in vitro* ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης θυροξίνης (T4) σε ορό.

### II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία: Kit T4-RIA-CT της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου: KIP1641: 96 προσδιορισμοί
- C. Κατασκευάζεται από την: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:  
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

### III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

#### A. Βιολογική δράση

Η L-θυροξίνη (T4) είναι μια ορμόνη, η σύνθεση και η αποθήκευση της οποίας γίνεται στο θυρεοειδή αδένα. Η πρωτεολυτική διάσπαση της θυροσφαιρίνης κατά την ωθυλακική φάση απελευθερώνει T4 στη ροή του αίματος. Ποσοστό άνω του 99% της T4 δεσμεύεται αντιστρεπτά στις τρεις πρωτεΐνες του πλάσματος στο αίμα – η θυροξινοδεσμευτική σφαιρίνη (TGB) δεσμεύει 70%, η θυροξινοδεσμευτική προλευκωματίνη (TBA) δεσμεύει 20% και η λευκωματίνη δεσμεύει 10%. Περίπου 0,03% της T4 είναι σε ελεύθερη, μη δεσμευμένη κατάσταση στο αίμα οποιαδήποτε χρονική στιγμή.

#### B. Κλινικές εφαρμογές

Παθήσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του θυρεοειδούς ενδέχεται να παρουσιάσουν ένα ευρύ φάσμα συμπτωμάτων που μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση ως προς την αιτιολογία τους. Η μέτρηση της ολικής T4 με ανοσοπροσδιορισμό είναι η πιο αξιόπιστη και πιο κατάλληλη εξέταση ελέγχου από αυτές που διατίθενται για να προσδιοριστεί η παρουσία διαταραχών του θυρεοειδούς σε ασθενείς. Αυξημένα επίπεδα T4 έχουν βρεθεί σε υπερθυρεοειδισμό λόγω της νόσου Grave και της νόσου Plummer και σε οξεία και υποξία θυρεοειδίτιδα. Χαμηλά επίπεδα T4 έχουν συσχετιστεί με συγγενή υποθυρεοειδισμό, μυξοίδημα, χρόνια θυρεοειδίτιδα (νόσος Hashimoto) και με μερικές γενετικές ανωμαλίες.

#### IV. ΒΑΣΙΚ ΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα T4 σημασμένης με  $^{125}\text{I}$  ανταγωνίζεται με την T4 που θα μετρηθεί, η οποία υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων T4, που είναι δεσμευμένα σε αντισώματα αντιποντικού από αίγα (GAM) ακινητοποιημένα στο τοίχομα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Μετά από επώση 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου, η αντιδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλέονται με 2 ml διάλυμα πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις του T4 των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

#### V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

| Αντιδραστήρια   | Κιτ 96 εξετάσεων            | Χρωματικός κωδικός | Ανασύσταση   |
|---|-----------------------------|--------------------|--|
| Σωληνάρια επιστρωμένα με GAM (αντισώματα)   | 2 x 48                      | μαύρο              | Έτοιμο για χρήση   |
| IXΝΗΘΕΤΗΣ: T4 σημασμένη με $^{125}\text{I}$ (κατηγορίας HPLC) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσεις καζεΐνη και οξίδιο (<0,1%) | 1 φιαλίδιο 21 ml<br>111 kBq | κόκκινο            | Έτοιμο για χρήση   |
| Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό, γενταμυκίνη και θυμέλη   | 1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο  | κίτρινο            | Προσθέστε 0.5 ml απεσταγμένου νερού                                      |
| Βαθμονομητής - N = 1 έως 5 (δείτε τις ακριβείς τιμές πάνω στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό, γενταμυκίνη και θυμέλη     | 5 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο  | κίτρινο            | Προσθέστε 0.5 ml απεσταγμένου νερού                                      |
| Αντι-T4 (μονοκλωνικά) αντισώματα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με βάσεις ορολευκωματίνη και θυμόλη                               | 1 φιαλίδιο λυοφιλοποιημένο  | μπλε               | Προσθέστε 11 ml απεσταγμένου νερού                                       |
| Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)   | 1 φιαλίδιο 10 ml            | καφέ               | Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα). |
| Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη   | 2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο  | ασημί              | Προσθέστε 1 ml απεσταγμένου νερού  |

**Σημείωση:** 1. Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις ορών.

#### VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

- Απεσταγμένο νερό
- Πιπέτες για διανομή: 20 μl, 100 μl, 200 μl και 500 μl (συνιστάται η χρήση πιπέτων ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
- Αναμείκτης στροβίλισμού (τύπου vortex)
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Αναδευτήρας σωληναρίων (700 rpm)
- Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
- Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
- Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης του  $^{125}\text{I}$  (ελάχιστη απόδοση 70%).

#### VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- Βαθμονομητές:** Ανασυστήστε τους βαθμονομητές με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0,5 ml απεσταγμένου νερού.
- Αντι-T4:** Ανασυστήστε τα αντι-T4 με 11 ml απεσταγμένου νερού.
- Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διάλυματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 δύκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διάλυματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

#### VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C.
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί επί 7 ημέρες στους 2-8°C. Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, θα πρέπει να δημιουργηθούν κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρηθούν σε θερμοκρασία -20°C Σ επί 3 μήνες το μεγίστο. Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Μετά την ανασύσταση, τα αντισώματα αντι-T4 παραμένουν σταθερά για 6 εβδομάδες στους 2-8°C. **MHN ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ.**
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

#### IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8°C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη στους -20°C.
- Αποφεύγετε τους επακόλουθους κύκλους κατάψυξης-απόψυξης.

#### X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό**  
Μή χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μήν αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμείξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπέτων υψηλής ακριβείας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

#### B. Διαδικασία

- Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, δείγμα και ορό ελέγχου. Για τους προσδιορισμούς των μετρήσεων του  $^{125}\text{I}$  ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
- Αναμίξτε για λίγο (με αναμείκτη στροβίλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, προαραιωμένα δείγματα και ορούς ελέγχου και διανείμετε 20 ml από έκαστα σε αντίστοιχα σωληνάρια.
- Διανείμετε 200 μl T4 σημασμένου με  $^{125}\text{I}$  σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβάνοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("total").
- Διανείμετε 100 μl αντι-T4 σε κάθε σωληνάριο, εκτός από τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("total").
- Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώστε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
- Επωάστε για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με συνεχή ανάδευση.
- Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του  $^{125}\text{I}$  ("total")). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.

- Πλύνετε τα σωληνάρια με 2 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη  $^{125}\text{I}$  ["total"]]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
- Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
- Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

### I. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{B/B0} (\%) = \frac{\text{Μετρήσεις (Βαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Μετρήσεις (Μηδενικός βαθμονομητής)}} \times 100$$

- Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συγκέντρωσης του T4 για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συγκέντρωσης 4 παραμέτρων.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B0 (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις T4 των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό των συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται απουσία του μη σημασμένου T4 (B0/T).

### XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

| T4   | cpm   | B/B0 (%) |
|--|-------|----------|
| Κρούσεις του ιχνηθέτη $^{125}\text{I}$ ("total") | 32598 | B/B0     |
| Βαθμονομητής                                     |       |          |
| 0 nmol/l   | 12661 | 100,0    |
| 12,8 nmol/l                                      | 11434 | 90,3     |
| 32 nmol/l  | 8460  | 66,8     |
| 80 nmol/l  | 4554  | 36,0     |
| 200 nmol/l                                       | 2020  | 16,0     |
| 500 nmol/l                                       | 932   | 7,4      |

### XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

#### A. Όριο ανίχνευσης

Υποβλήθηκαν σε προσδιορισμό είκοσι μηδενικού βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες καταμετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν  $< 5 \text{ nmol/l}$ .

#### B. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται με σύγκριση της συγκέντρωσης που αποδίδει αναστολή 50%, είναι αντίστοιχα:

| Ένωση                            | Διασταυρούμενη αντίδραση (%) |
|----------------------------------|------------------------------|
| L-θυροξίνη (L-T4)                | 100                          |
| D-θυροξίνη (D-T4)                | 48                           |
| L-3,3',5'-τριϊωδοθυρονίνη (L-T3) | 1,01                         |
| L-3,3',5'-τριϊωδοθυρονίνη (rT3)  | 7                            |

**Σημείωση:** Στον πίνακα αυτό παρουσιάζεται η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα για την αντί-T4.

### Γ. Ακρίβεια

#### ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

#### ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

| Ορός | N  | $\langle X \rangle \pm \text{T.A.}$ (nmol/l) | Σ.Δ. (%) | Ορός | N  | $\langle X \rangle \pm \text{T.A.}$ (nmol/l) | Σ.Δ. (%) |
|------|----|--|----------|------|----|--|----------|
| A    | 10 | $32,4 \pm 1,8$                               | 5,6      | A    | 18 | $32,7 \pm 2,1$                               | 6,5      |
| B    | 10 | $183,8 \pm 5,9$                              | 3,2      | B    | 20 | $235,3 \pm 15,2$                             | 6,5      |

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

### Δ. Ορθότητα

#### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

| Δείγμα | Αραίωση | Θεωρητική συγκέντρωση (nmol/l) | Μετρηθείσα συγκέντρωση (nmol/l) |
|--------|---------|--------------------------------|---------------------------------|
| A      | 1/1     | -                              | 425                             |
|        | 1/2     | 212,5                          | 194,3                           |
|        | 1/4     | 106,3                          | 89,1                            |
|        | 1/8     | 53,1                           | 48,8                            |
|        | 1/16    | 26,6                           | 22,5                            |

Τα δείγματα αραιώθηκαν με μηδενικό βαθμονομητή.

#### ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

| Δείγμα | Προστεθείσα T4 (nmol/l) | Ανακτηθείσα T4 (nmol/l) | Ανακτηθείσα (%) |
|--------|-------------------------|-------------------------|-----------------|
| 1      | 32,2                    | 27,1                    | 84%             |
|        | 64,4                    | 67,8                    | 105%            |
|        | 128,7                   | 132,6                   | 103%            |
|        | 257,4                   | 290,5                   | 113%            |
|        | 386,1                   | 444,8                   | 115%            |

Από όσο είναι δυνατό να γνωρίζουμε, δεν υπάρχει διεθνές υλικό αναφοράς για την παράμετρο αυτή.

#### E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται πιο κάτω, η διανομή των δειγμάτων πρέπει να γίνεται εντός διαστήματος 60 λεπτών το μέγιστο μετά τη διανομή του βαθμονομητή.

#### ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

| Ορός nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|-------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1         | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2         | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

### XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλίδιου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δύσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

### XV. ΤΙΜΕΣ ΑΝΑΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών. Οι συγκεντρώσεις της T4 για ενθυρεοειδικά άτομα, που δεν έχουν υποβληθεί σε θεραπεία, κυμαίνονται από 60 έως 157 nmol/l (n=298). Το εύρος κυμαίνεται από 2,5% έως 97,5%

## XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

### Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση *in vitro*.

Το κιτ αυτό περιέχει το  $^{125}\text{I}$  (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονιζόμενα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αντό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χρηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύες του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολύνθουν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοισότοπων. Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδόσια στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο κιτ αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HbsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αξιό διο την νατρίου ως συντηρητικό). Το αξιό διο στο κιτ αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών συλληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αξιό δια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αξιό διο.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τράτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

## XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

|  | ΚΡΟΥΣΕΙΣ<br>"TOTAL"<br>μl              | ΒΑΘΜΟΝΟ<br>ΜΗΤΕΣ<br>μl   | ΔΕΙΓΜΑ (ΤΑ)<br>ΟΡΟΙ<br>ΕΛΕΓΧΟΥ<br>μl |
|--|--|--|--------------------------------------|
| Βαθμονομητές (0 έως 5)<br>Δείγματα, οροί ελέγχου<br>Ιχνηθέτης<br>Αντι-T4 | -<br>-<br>200<br>-                     | 20<br>-<br>200<br>100  | -<br>20<br>200<br>100                |
| Επώαση   | 1 ώρας σε θερμοκρασία δωματίου         |  |                                      |
| Διαχωρισμός<br>Διάλυμα πλύσης εργασίας<br>Διαχωρισμός                    | -                                      | Αναρρόφηση (ή μετάγγιση)<br>2,0 ml<br>Αναρρόφηση (ή μετάγγιση) |                                      |
| Μέτρηση  | Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα |  |                                      |

CE

pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

## T4-RIA-CT

### I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiej tyroksyny (T4) w surowicy.

### II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa: DIAsource T4-RIA-CT
- B. Numer katalogowy: KIP1641 : 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:  
Tel: +32 (0)10 84.99.11                      Fax: +32 (0)10 84.99.91

### III. INFORMACJE KLINICZNE

#### A. Aktywność biologiczna

L-tyroksyna (T4) jest hormonem syntetyzowanym i przechowywanym w gruczoł tarczowym. Aktywność proteolityczna tyreoglobulin pęcherzykowej prowadzi do uwalniania T4 do krwiobiegu. Ponad 99% T4 jest odwrotnie związane z trzema proteinami osocznymi występującymi we krwi – globulina wiążąca tyroksynę (TGB) wiąże 70%, prealbumina wiążąca tyroksynę (TBA) wiąże 20% i albumina wiąże 10% hormonu. Około 0,03% T4 występuje zawsze we krwi w postaci wolnej, niezwiązanego.

#### B. Zastosowanie kliniczne

Choroby wpływające na funkcję tarczycy mogą być powodem wielu mylących objawów. Pomiar T4 metodą immunoenzymatyczną jest najbardziej wiarygodną i wygodną metodą badań przesiewowych w kierunku chorób tarczycy. Podwyższone poziomy T4 można spotkać w nadczynności tarczycy wywołanej chorobą Graves-Basedowa oraz chorobą Plummera i ostrym oraz podostrym zapaleniem tarczycy. Niskie poziomy T4 występują we wrodzonej niedoczynności tarczycy, obrzęku śluzowatym, przewlekłym zapaleniu tarczycy (choroba Hashimoto) oraz niektórych wadach genetycznych.

#### IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru T4 w próbce lub w kalibratorze, znana ilość cząsteczek T4 oznakowanych J<sup>125</sup> współzawodniczy z T4 o określonej ilości miejsc wiążących przeciwiała anty-T4, związkanych z przeciwiałami kozimi i mysimi (GAM), unieruchomionymi na ścianie probówki polistyrenowej. Po jednogodzinnej inkubacji w temperaturze pokojowej reakcja współzawodnictwa jest przerywana przez aspirację. Następnie próbówki są płukane przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego i aspirowane. Wykreslana jest krzywa kalibracyjna a stężenia T4 w próbkach są określone przez interpolację dawki z krzywej kalibracyjnej.

#### V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

| Odczynniki   | Zestaw<br>96<br>oznaczeń              | Kolor     | Rekonstytucja  |
|--|---------------------------------------|-----------|--|
| Probówki opłaszczone GAM (kozie i mysie)   | 2 x 48                                | czarny    | <b>Gotowe do zastosowania</b>  |
| Ag <sup>125</sup> I  | 1 fiołka<br>21 ml<br>111 kBq          | czerwony  | <b>Gotowe do zastosowania</b>  |
| ZNACZNIK IZOTOPOWY: T4 oznakowany jodem <sup>125</sup> (poziom HPLC) w buforze fosforanowym z kazeiną bydlęcą i azydkiem (<0,1%) | 1 fiołka<br>material liofilizow any.  | żółty     | <b>Dodać 0,5 ml wody destylowanej</b>  |
| CAL      0<br>Kalibratory zerowe w ludzkiej surowicy, gentamycyna i tymol.   | 5 fiołek<br>material liofilizow any.  | żółty     | <b>Dodać 0,5 ml wody destylowanej</b>  |
| CAL      N<br>Kalibratory - N = od 1 do 5 (dokładne wartości na etykietach fiolek) w ludzkiej surowicy z gentamycyną i tymolem   | 1 fiołka<br>material liofilizow any   | niebieski | <b>Dodać 11 ml wody destylowanej</b>   |
| Ab<br>Przeciwciała anty-T4 (monoklonalne) w buforze fosforanowym z albuminą z surowicy bydlęcej i tymolem                        | Roztw<br>ór pluczający (TRIS-HCl)     | brązowy   | <b>Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).</b> |
| WASH      SOLN      CONC<br>Kontrol - N = od 1 do 2 w plazma ludzka z tymolem  | 2 . fiołek<br>material liofilizow any | srebrny   | <b>Dodać 0,5 ml wody destylowanej</b>  |

**Uwaga :** Dla rozcieńczeń surowicy należy stosować kalibrator zerowy.

#### VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 20 µl, 100 µl, 200 µl, i 500 µl (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastиковymi)
3. Mieszałko wirowe
4. Mieszałko magnetyczne
5. Wytrząsarka do próbówek (700 rpm)
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakikolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru <sup>125</sup>I (minimalny uzysk 70%)

#### VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Kalibratory:** Rekonstytuować kalibratorzy przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

**B. Kontrole:** Kontrole należy rekonstytuować przy pomocy 0,5 ml wody destylowanej.

- C. Anty-T4:** Rekonstytuować anty-T4 przy pomocy 11 ml wody destylowanej.
- D. Roboczy roztwór pluczający:** Właściwą objętość roboczego roztworu pluczającego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu pluczającego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór pluczający należy wylać pod koniec dniaSolution .

#### VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstytucją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C.
- Po rekonstytucji, kalibratorzy i kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C. W celu dłuższego przechowywania, należy zamrozić w małych objętościach. Możliwe jest wówczas przechowywanie przez maksymalnie 3 miesiące, w temperaturze -20°C. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Po rekonstytucji, przeciwiała anty-T4 są stabilne przez 6 tygodni w temperaturze 2-8°C. **NIE ZAMRAŻAĆ.**
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór pluczający powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po jego pierwszym zastosowaniu, znaczek izotopowy zachowuje trwałość do podanej daty ważności jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce w temperaturze od 2 do 8°C.
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

#### IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze 2-8°C.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w temperaturze -20°C.
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

#### X. PROCEDURA

##### A. Uwagi dotyczące obsługi

- Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upłynięciu podanej daty ważności.  
Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawią precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

##### B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratorzy, próbki i kontrole, i dozować po 20 µl każdej substancji do odpowiednich próbówek.
3. Do każdej próbówki, w tym do próbówek nieopłaszczonych do całkowitego zliczania, dodać po 200 µl T4 oznakowanego Jodem<sup>125</sup>.
4. Do każdej próbówki, poza próbówkami do całkowitego zliczenia dodać 100 µl przeciwiała anty-T4.
5. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwięzionych pęcherzyków powietrza.
6. Inkubować przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, nieprzerwanie wytrząsając.
7. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastyczowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
8. Przepłukać próbówki przy pomocy 2 ml roboczego roztworu pluczającego (z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu pluczającego należy unikać wytwarzania piany.
9. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
10. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

## XI. OBLCZANIE WYNIKÓW

- Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
- Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiążania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba liczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba liczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

- Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości ( $B/B_0(\%)$ ) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia T4 każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
- Nakładając wartości ( $B/B_0 (\%)$ ) próbki należy określić stężenia T4 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
- Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego T4 ( $B_0/T$ ).

## XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

| T4                  | cpm         | B/B <sub>0</sub> (%)                         |
|---------------------|-------------|--|
| Zliczanie całkowite | 32598       | B/B <sub>0</sub>                             |
| Kalibrator          | 0 nmol/l    | 12661  |
|                     | 12.8 nmol/l | 11434  |
|                     | 32 nmol/l   | 8460   |
|                     | 80 nmol/l   | 4554   |
|                     | 200 nmol/l  | 2020   |
|                     | 500 nmol/l  | 932  |
|                     |             | 100.0<br>90.3<br>66.8<br>36.0<br>16.0<br>7.4 |

## XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

### A. Granica wykrywania

Dwadzieścia kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów. Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiążaniu zerowym kształtała się na poziomie < 5 nmol/l.

### B. Swoistość

Odsetki reaktywności krzyżowej uzyskane przez porównanie stężenia uzyskującego 50% hamowania są następujące:

| Składnik                           | Reaktywność krzyżowa (%) |
|------------------------------------|--------------------------|
| L- tyrosyna (L-T4)                 | 100                      |
| D-tyrosyna (D-T4)                  | 48                       |
| L-3,3',5 - trójjodotyronina (L-T3) | 1.01                     |
| L-3,3',5 - trójjodotyronina (rT3)  | 7                        |

Uwaga: tabela przedstawia reaktywność krzyżową dla anty-T4

### C. Precyzyja

#### PRECYZJA W SERII

#### PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

| Surowica | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) | Surowica | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) |
|----------|----|---------------------------|--------|----------|----|---------------------------|--------|
| A        | 10 | $32.4 \pm 1.8$            | 5.6    | A        | 18 | $32.7 \pm 2.1$            | 6.5    |
| B        | 10 | $183.8 \pm 5.9$           | 3.2    | B        | 20 | $235.3 \pm 15.2$          | 6.5    |

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

## D. Dokładność

### BADANIE ROZCIEŃCZENIA

| Próbka | Rozcieńczenie | Stęž. teoretyczne (nmol/l) | Stęž. zmierzona (nmol/l) |
|--------|---------------|----------------------------|--------------------------|
| A      | 1/1           | -                          | 425                      |
|        | 1/2           | 212.5                      | 194.3                    |
|        | 1/4           | 106.3                      | 89.1                     |
|        | 1/8           | 53.1                       | 48.8                     |
|        | 1/16          | 26.6                       | 22.5                     |

Próbki zostały rozcieńczone za pomocą kalibratora zerowego.

### BADANIE ODZYSKU

| Próbka | Dodano T4 (nmol/l) | Odzyskany T4 (nmol/l) | Odysk (%) |
|--------|--------------------|-----------------------|-----------|
| 1      | 32.2               | 27.1                  | 84%       |
|        | 64.4               | 67.8                  | 105%      |
|        | 128.7              | 132.6                 | 103%      |
|        | 257.4              | 290.5                 | 113%      |
|        | 386.1              | 444.8                 | 115%      |

Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, dla opisywanego parametru nie istnieją międzynarodowe materiały referencyjne.

### E. Odstęp czasowy pomiędzy dozowaniem ostatniego kalibratora i próbki

Jak tutaj wykazano, wyniki testu pozostają dokładne nawet wówczas, gdy próbka zostanie dozowana w 60 minut po dodaniu do opłaszczonych próbówek kalibratora.

### ODSTĘP CZASOWY

| Surowica nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|-----------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1             | 46.5  | 43.0  | 38.6  | 36.4  |
| C 2             | 202.5 | 212.6 | 207.3 | 201.0 |

## XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiolki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

## XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne. Stężenia T4 dla nieleczonych osób w eutreozie (n=298) obejmują zakres od 60 do 157 nmol/l. Zakresy wyrażono jako 2,5% do 97,5% percentyla.

## XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

### Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera  $^{125}\text{I}$  (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i  $\gamma$  (35.5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być prowadzona w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone

substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwiał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności, że materiały pochodzenia ludzkiego nie przenoszą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbками surowiczy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierającymi azydęk sodowy jako środek konserwujący). Azydęk znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołówkiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

## XVII. BIBLIOGRAFIA

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

|   | CAŁKOWITA<br>LICZBA<br>ZLICZEŃ<br>μl                           | KALIBRATORY<br>μl  | PRÓBKI<br>KONTROL<br>E<br>μl |
|---|--|--|------------------------------|
| Kalibratory (0 - 5)<br>Próbki , kontrole<br>Znacznik<br>Anty-T4 | -<br>-<br>200<br>-   | 20<br>-<br>200<br>100  | -<br>20<br>200<br>100        |
| Inkubacja   | 1 godzinę w temperaturze pokojowej, nieprzerwanie wytrząsając. |  |                              |
| Rozdzielenie<br>Roboczy roztwór<br>pluczący<br>Rozdzielenie     | -  | Aspiracja (lub odlewanie)<br>2,0 ml<br>Aspiracja (lub odlewanie) |                              |
| Zliczanie   | Zliczanie próbówek przez 60 sekund                             |  |                              |

bu



Прочетете целия протокол преди употреба

## T4-RIA-CT

### I. УПОТРЕБА

Радиоимунно изследване за количествено измерване *in vitro* на човешки тироксин (T4) в серум.

### II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource T4-RIA-CT Kit  
B. Каталожен номер: KIP1641: 96 теста  
C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.  
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:  
Тел.: +32 (0)10 84.99.11      Факс: +32 (0)10 84.99.91

### III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

#### A. Биологична активност

L-тироксинът (T4) е хормон, който се синтезира и съхранява в щитовидната жлеза. При протеолитичното разцепване на фоликуларния тиреоглобулин T4 се освобождава в кръвотока. Повече от 99% от T4 се свързва обратно с трите плазмени протеина – тироксин-свързваният глобулин (TGB) свързва 70%, тироксин-свързваният преалбумин (TBA) свързва 20%, а албуминът свързва 10%. Приблизително 0.03% от T4 е в свободно, несвързано състояние в кръвта по всяко време.

#### B. Клинични приложения

Заболяванията, засягащи функцията на щитовидната жлеза, могат да се проявяват с голямо разнообразие от обръкващи симптоми. Измерването на общия T4 чрез радиоимунно изследване е най-надеждният и удобен скринингов тест за определяне наличието на нарушения във функциите на щитовидната жлеза при различните пациенти. Повишени нива на T4 се откриват при хипертиреоидизъм, дължащ се на токсична дифузна струма и токсичен аденом на щитовидната жлеза, както и при остьр и подостър тиреоидит. Ниските нива на T4 се свързват с вроден хипотиреоидизъм, микседема, хроничен тиреоидит (болест на Хашимото) и при някои генетични нарушения.

#### IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество натоварен с  $^{125}\text{I}$  T4 се конкурира с наличния в проба или калибратор андростендон, подлежащ на измерване, за определено количество центрове на специфични антитела на анти-T4, които са свързани с кози антитела против мишки (GAM), имобилизираны към стените на полистиролова епруветка. След едночасова инкубация на стайна температура конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват с 2 ml Работен Измиващ Разтвор и се аспирират напомо. Начертава се калибрационна крива, а концентрациите на T4 в пробите се определят чрез интерполяция на дозата от калибрационната крива.

#### V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

| Реагенти   | Количество<br>во<br>96 теста | Цветен<br>код | Приготвяне  |
|--|------------------------------|---------------|---|
| Епруветки, покрити с GAM (кози антитела против мишки)  | 2 x 48                       | черен         | Готов за употреба   |
| Ag <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;"><math>^{125}\text{I}</math></span>   | 1 флакон<br>21 ml<br>111 kBq | червен        | Готов за употреба   |
| ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕШЕСТВО: T4, натоварен с $^{125}\text{I}$ йод (HPLC скала) във фосфатен буфер с волски казеин и азид (<0.1%)             |                              |               |   |
| CAL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">0</span>  | 1 флакон лиофилизиран        | жълт          | Добавете 0,5 ml дестилирана вода                                  |
| Нулев Калибратор в човешки серум с тимол и гентамицин  |                              |               |   |
| CAL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>  | 5 флакон лиофилизиран        | жълт          | Добавете 0,5 ml дестилирана вода                                  |
| Калибратор - N = 1 до 5 (виж точните стойности на етикета на флаconите) в човешки серум с тимол и гентамицин                           |                              |               |   |
| Ab   | 1 флакон лиофилизиран        | син           | Добавете 11 ml дестилирана вода                                   |
| Анти-T4 (моноклонални) антитела във фосфатен буфер с волски серумен албумин и тимол  |                              |               |   |
| WASH <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SOLN</span> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">CONC</span> | 1 флакон 10 ml               | кафяв         | Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор) |
| Измиващ разтвор (TRIS-HCl)   |                              |               |   |
| CONTROL <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">N</span>  | 2 флакона лиофилизиран       | сребърен      | Добавете 0,5 ml дестилирана вода                                  |
| Контроли 1 и 2 в човешки плазма с тимол  |                              |               |   |

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.

#### VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

- Дестилирана вода
- Пипети от: 20  $\mu\text{l}$ , 100  $\mu\text{l}$ , 200  $\mu\text{l}$  и 500  $\mu\text{l}$  (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
- Завихрящ смесител
- Магнитен сепаратор
- Клатеш устройство за епруветки
- 5 ml автоматична спринцовка (тип Cornwall) за измиване
- Аспирационна система (по избор).
- Всякакъв гама броач, който може да измери употребеното количество  $^{125}\text{I}$  (минимален капацитет от 70%).

#### VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- Калибратори :** Реконституирайте калибраторите с 0,5 ml дестилирана вода.
- Контроли:** Реконституирайте контролите с 0,5 ml дестилирана вода.
- Анти-T4:** Реконституирайте анти-T4 с 11 ml дестилирана вода.

**D. Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирайте. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на дения.

#### VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2 °C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, калибраторите и контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури 2-8°C. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратко и се съхранява при температура -20 °C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- След реконституирането анти-T4 антителата са стабилни в продължение на 6 седмици при 2-8°C. **НЕ ЗАМРАЗЯВАЙТЕ.**
- Прясно приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След първата употреба, трейсера е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2-8°C.
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

#### IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхранява при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхранение при температура -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

#### X. ПРОЦЕДУРА

##### A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партиди китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кърстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрели точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

##### B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрол и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 20  $\mu\text{l}$  от всяко в съответните епруветки.
- Разпределете 200  $\mu\text{l}$  T4, натоварен с  $^{125}\text{I}$ йод във всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото пребояване.
- Разпределете 100  $\mu\text{l}$  анти-T4 във всяка епруветка, с изключение на тези за определяне на общия брой импулси.
- Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
- Инкубирайте за 1 час на стайна температура и непрекъснато раклащане.
- Аспирарайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дължина на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Измийте епруветките с 2 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирарайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирарайте останалите капки течност.
- Отчетете епруветките в гама броач за 60 секунди.

##### XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветки.

- Изчислете свързвашата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
- Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на T4 концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

- Компютърно асистирани методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
- Чрез интерполяция на (B/B0 (%)) стойностите от пробата се определят T4 концентрациите на пробите от калибрационната крива.
- Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен T4 (B0/T), трябва да се провери за всяко изследване.

## XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

| T4          | сpm   | B/B0 (%) |
|-------------|-------|----------|
| Общ брой    | 32598 | B/B0     |
| Калибратор  |       |          |
| 0 nmol/l    | 12661 | 100,0    |
| 12,8 nmol/l | 11434 | 90,3     |
| 32 nmol/l   | 8460  | 66,8     |
| 80 nmol/l   | 4554  | 36,0     |
| 200 nmol/l  | 2020  | 16,0     |
| 500 nmol/l  | 932   | 7,4      |

## XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

### A. Определен лимит

Двадесет нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил < 5 nmol/l.

### B. Специфичност

Процентът на кръстосана реакция, преценен чрез сравняване с концентрацията при 50% потискане, е съответно:

| Съединение                       | Кръстосана реактивност (%) |
|----------------------------------|----------------------------|
| L-тироксин (L-T4)                | 100                        |
| D-тироксин (D-T4)                | 48                         |
| L-3,3',5 - трийодотиронин (L-T3) | 1,01                       |
| L-3,3',5' - трийодотиронин (rT3) | 7                          |

Забележка: тази таблица показва кръстосаната реактивност за анти T4

### G. Препцизност

#### ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

#### МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

| Серум | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) | Серум | N  | $\bar{X} \pm SD$ (nmol/l) | CV (%) |
|-------|----|---------------------------|--------|-------|----|---------------------------|--------|
| A     | 10 | $32,4 \pm 1,8$            | 5,6    | A     | 18 | $32,7 \pm 2,1$            | 6,5    |
| B     | 10 | $183,8 \pm 5,9$           | 3,2    | B     | 20 | $235,3 \pm 15,2$          | 6,5    |

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

### D. Точност

#### ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

| Проба | Разреждане | Теоретична концентрация (nmol/l) | Измерена концентрация (nmol/l) |
|-------|------------|----------------------------------|--------------------------------|
| A     | 1/1        | -                                | 425                            |
|       | 1/2        | 212,5                            | 194,3                          |
|       | 1/4        | 106,3                            | 89,1                           |
|       | 1/8        | 53,1                             | 48,8                           |
|       | 1/16       | 26,6                             | 22,5                           |

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

#### ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

| Проба | добавен T4 (nmol/l) | Възстановен T4 (nmol/l) | Възстановен (%) |
|-------|---------------------|-------------------------|-----------------|
| 1     | 32,2                | 27,1                    | 84%             |
|       | 64,4                | 67,8                    | 105%            |
|       | 128,7               | 132,6                   | 103%            |
|       | 257,4               | 290,5                   | 113%            |
|       | 386,1               | 444,8                   | 115%            |

Доколкото ни е известно, за този параметър не съществува международен референтен материал.

### D. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 60 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

#### Закъснение

| Серум nmol/l | 0'    | 20'   | 40'   | 60'   |
|--------------|-------|-------|-------|-------|
| C 1          | 46,5  | 43,0  | 38,6  | 36,4  |
| C 2          | 202,5 | 212,6 | 207,3 | 201,0 |

## XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни преби, които трябва да съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

## XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

Концентрациите на T4 при нелекувани субекти с еутиреоидизъм (n=298) варират от 60 до 157 nmol/l. Интервалите се изразяват в проценти: от 2,5% до 97,5%.

## XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

### Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа  $^{125}\text{I}$  (полуживот: 60 дни), еmitиращ йонизиращи X (28 keV) и  $\gamma$  (35,5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извърши в определена за целта територия, далеч от регуляри зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионизотопи.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените преби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност.

Всички животински продукти и деривати са били събираны от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекционни.

Избягвайте каквото и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със сила и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за едноократна употреба.

## XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1. Davis J.P. (1991)  
**Cellular actions of thyroid hormones.**  
The Thyroid. 190-230. 6<sup>th</sup> ed. Braverman L.E., Ultiger R.D.
2. Stockigt J.R. (1996)  
**Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness.**  
Clin. Chem. 42 (1); 188-192.
3. Fisher D.A. (1996)  
**Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations.**  
Clin. Chem. 42 (1); 135-139.
4. Nelson J.C. and Wilcox R.B. (1996)  
**Analytical performance of free and total thyroxine assays.**  
Clin. Chem. 42 (1); 146-154.
5. Robbins, J. (1973)  
**Radioassay and Thyroid Gland.**  
Metabolism, 22 (8) : 1021.

## XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

|                   | ОБЩА АКТИВНОСТ $\mu\text{l}$                          | КАЛИБРАТОРИ $\mu\text{l}$            | ПРОБА (И) КОНТРОЛИ $\mu\text{l}$ |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------------------|
| Калибратори (0-5) | -   | 20                                   | -                                |
| Проби, контроли   | -   | -                                    | 20                               |
| Трейсър           | 200   | 200                                  | 200                              |
| Анти-T4           | -   | 100                                  | 100                              |
| Инкубация         | 1 час на стайна температура при непрекъснато разклаща |                                      |                                  |
| Сепарация         | -   | аспирirайте (или прелейте)<br>2.0 ml |                                  |
| Измиващ разтвор   | -   | аспирirайте (или прелейте)           |                                  |
| Сепарация         | -   |                                      |                                  |
| Броене            | Отчетете спрютките за 60 секунди                      |                                      |                                  |