

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com

de
medi
tec

EN ISO 9001
certified company



User's Manual

T4, free RIA

Radioimmunoassay for the in vitro determination of free Thyroxine in human serum and plasma

Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von freiem Thyroxin in humanem Serum und Plasma



DE07100/DE07300



100/300 tubes

EINLEITUNG

Thyroxin (T4) ist die Haupt-Jodverbindung im Blutkreislauf. Dieses Aminosäure-Hormon mit einem Molekulargewicht von 777 Da übt seine biologische Aktivität meistens nach der Dejodierung zum Trijodthyronin (T3) aus. Im zellulären Stoffwechsel wirkt T3 über Rezeptoren im Zellkern.(1) Im Blut zirkuliert das Thyroxin in gebundener Form an Bindungsproteine wie das thyroxin-bindende Globulin (TBG), thyroxin-bindende Präalbumin (TBPA) und Albumin. Die ungebundene, freie-T4 Konzentration, die ca. nur 0,03% der Gesamt-Hormon-Konzentration ausmacht, ist für die biologische Aktivität verantwortlich.(2) Die freie T4-Konzentration im Serum hängt, anders als bei der T3/T4 Gesamtkonzentration, nicht von der Menge an Bindungsproteinen ab und bleibt daher unverändert, auch wenn z.B. durch Schwangerschaft, bei Einnahme von Östrogenen, Kontrazeptiva o.ä. die TBG-Werte im Serum erhöht sind oder sich erniedrigen z.B. bei der Einnahme von Androgenen, Salicylaten oder bei angeborenen Störungen sowie beim nephrotischem Syndrom.

Die freie T4-Konzentration im Serum spiegelt dann den tatsächlichen Zustand der Schilddrüse wieder.(3) Abnormal hohe freie T4-Konzentrationen findet man bei zentraler und peripherer Schilddrüsenüberfunktion sowie bei Thyroxin Behandlungen. Auffällig niedrige Konzentrationen werden bei der Hypothyreose gemessen sowie in einigen Fällen bei den sog. NTI (Non-Thyroid-Illness) Patienten mit schweren, nicht-schilddrüsen-bedingten Allgemeinerkrankungen verbunden mit dem sog. Low-T4-Syndrom.(4)

TESTPRINZIP

Der Radioimmunoassay freies Thyroxin (T4) ist ein kompetitiver Bindungsassay und basiert auf markierten Antikörpern. Proben, Kontrollen und Standards werden mit ¹²⁵I-markierten monoklonalen Antikörpern spezifisch für T4, als Tracer, in Anwesenheit eines biotinilierten Analogs für Thyroxin (Ligand) in Avidin-beschichteten Röhrchen inkubiert. Die Bindung des markierten Antikörpers findet in Konkurrenz zwischen dem freien Thyroxin der Probe und dem Ligand statt. Die mit dem biotinilierten Ligand komplexierten Antikörper binden an die Avidin-beschichteten Röhrchen. Nach der Inkubation wird die Flüssigkeit abgesaugt bzw. dekantiert und die gebundene Menge an Radioaktivität gemessen. Unbekannte Probenwerte werden mittels Interpolation aus der Standardkurve bestimmt.

WARN- UND SICHERHEITSHINWEISE

Allgemeinhinweise

- Die Kalibrator- und Kontrollfläschchen sollten so kurz wie möglich geöffnet werden, um eine übermäßige Verdunstung zu vermeiden.
- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Eine Standardkurve ist für jeden Assay notwendig.
- Die korrekte Einstellung des Schüttlers ist sehr wichtig für die Reproduzierbarkeit des Assays.
- Der Assay sollte in Doppelbestimmung durchgeführt werden.
- Jedes Röhrchen darf nur einmal verwendet werden.

Grundregeln der Handhabung von Radioaktivität

Annahme, Besitz und Verwendung, Lagerung, Transport und Beseitigung unterliegen den Vorschriften der Atomenergie- bzw. der jeweiligen staatlichen Behörde. Die Einhaltung der Grundregeln beim Umgang mit Radioaktivität sollte eine ausreichende Sicherheit gewährleisten:

- In Räumen, in denen mit radioaktiven Materialien gearbeitet wird, sollte Essen, Trinken, Rauchen und das Auftragen von Kosmetika vermieden werden.
- Keine Mundpipette verwenden.
- Direkter Kontakt mit radioaktiven Materialien sollte durch Tragen entsprechender Schutzkleidung (Laborkittel, Handschuhe) vermieden werden.
- Das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen muss in dafür speziell gekennzeichneten Bereichen, die vom normalen Laborbetrieb abgetrennt sind, erfolgen.
- Radioaktive Materialien sollten in einem speziell gekennzeichneten Bereich gelagert werden.
- Ein Register der Eingänge und Lagerung aller radioaktiven Produkte sollte ständig aktualisiert werden.
- Kontaminierte Labor- und Glasgeräte sollten isoliert werden, um eine Kreuzkontamination von verschiedenen Radioisotopen zu verhindern.
- Kontaminationen des Arbeitsplatzes müssen unverzüglich sorgfältig nach den üblichen Verfahren entfernt werden.
- Radioaktiver Abfall muss entsprechend den Richtlinien jedes Einsatzortes entsorgt werden.

Natriumazid

Zur Vermeidung mikrobieller Kontamination enthalten einige Reagenzien Natriumazid. Natriumazid kann mit Blei, Kupfer oder Messing zu explosiven Metallaziden reagieren. Um dies zu vermeiden, sollte bei einer Entsorgung über Rohrleitungen mit viel Wasser nachgespült werden.

Bestandteile menschlichen Ursprungs

Bestandteile menschlichen Ursprungs, die für diesen Kit verwendet wurden, sind auf HIV-1 und HIV-2 Antikörper, HCV Antikörper und Hepatitis B surface Antigen (HbsAg) getestet und als nicht reaktiv befunden wurden. Es ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr bestünde. Keine Testmethode kann völlige Sicherheit bieten. Der Kit sollte mit allen notwendigen Sicherheitsvorkehrungen behandelt werden.

Mit allen Serum- und Plasmaproben ist so vorzugehen, als ob eine tatsächliche Ansteckungsgefahr für Hepatitis oder AIDS bestünde. Abfall sollte entsprechend den nationalen Richtlinien entsorgt werden.

PACKUNGSINHALT

Reagenzienpackung ist ausreichend für 100 bzw. 300 Bestimmungen.

Die in der Packung enthaltenen Reagenzien sind bei 2-8°C haltbar bis zum angegebenen Verfallsdatum auf den Etiketten.

Die Reagenzien sind nach dem Öffnen verwendbar bis zum angegebenen Verfallsdatum der Reagenzienpackung, wenn diese bei 2-8°C gelagert wird.

Die auf den Flaschen- Etiketten angegebenen Tiefkühltemperaturen gelten nur für die Langzeitlagerung, bitte nicht beachten!!

SORB CT 100 (300) Coated-Tubes; gebrauchsfertig

2 (6) x 50 Avidin-beschichtete Coated-Tubes zur Bindung des Liganden

Anti-T4 I-125 I-125-Anti-T4-Antikörper Lösung; gebrauchsfertig

1 (3) Flasche(n) mit jeweils 45,0 ml I-125 markierte monoklonale Anti-T4-Antikörper-Lösung (markiertes Immunglobulin in flüssiger Form mit bovinem Serum Albumin Natriumazid (<0,1%) und Farbstoff); Aktivität: (ab Herstellungsdatum) ≤ 310 kBq / pro Flasche

LIG Ligand; gebrauchsfertig

1 (3) Flasche(n) mit 12,0 ml Ligand-Lösung enthält bovines Serum Protein und Natriumazid (< 0,1%)

CAL Standards; gebrauchsfertig

1 Set mit 5 Flaschen mit jeweils 0,5 ml Inhalt.

Die Fläschchen enthalten T4 in humanem Serum mit Natriumazid & Farbstoff.

Konzentrationsbereich: 0 bis ca. 75 pmol/L.

Die genauen Konzentrationen sind der Packungsbeilage zu entnehmen.

CONTROL Kontrolle 1 & 2; lyophilisiert

2 Flaschen mit je 0,5 ml Inhalt.

Die Kontrollseren werden mit 0,5 ml Aqua dest. gelöst, vorsichtig mischen und vor Gebrauch ca. 10 bis 15 Minuten warten. Die Konzentrationsbereiche sind dem QC Datenblatt zu entnehmen.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- Mikropipette (25µl; 100µl)
- Multipipette (400µl)
- Schüttler (mind. 300 - 350 UpM)
- Absaugsystem bzw. Dekantierzubehör
- Gamma-Counter
- Vortex-Mixer

VORBEREITUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

Es können Serum- oder Plasmaproben (EDTA oder Heparin) mit diesem Assay bestimmt werden. Proben können bei 2-8°C bis zu 3 Tagen oder bei -20°C für 3 Wochen gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

TESTDURCHFÜHRUNG**Vorbereitung der Reagenzien**

Die in der Packung enthaltenen Reagenzien sind vor Gebrauch auf Raumtemperatur zu bringen!
Nach dem Öffnen & Pipettieren der Standards und Kontrollen müssen diese fest verschlossen werden und bei 2 – 8°C gelagert werden!

Durch Evaporation offener Flaschen können weitere Test-Ergebnisse beeinträchtigt werden!

Qualitätskontrolle und Hinweise zur Testdurchführung

- Reagenzien aus Kits von verschiedenen Produktionsserien sollten nicht miteinander vermischt werden.
- Proben und Reagenzien vor Verwendung sorgfältig mischen
- Starke Schaumbildung vermeiden.
- Für jeden Testansatz eine eigene Standardkurve erstellen.
- Es liegt in der Verantwortung des Labors Kontrollen und Proben als Doppel- oder Einzelbestimmung durchzuführen. Im Rahmen einer verantwortungsvollen Laborarbeit sollten Kontrollserien mitgeführt werden, um die Testdurchführung zu überprüfen.

ARBEITSANLEITUNG

Es wird empfohlen, den Testansatz in Doppelbestimmung durchzuführen.

- In jedes Röhrchen werden je 25µl Standard, Kontrolle oder Probe pipettiert.
- Zu allen Röhrchen je 400µl der I-125- Tracer-Ak-Lösung pipettieren Zu allen Röhrchen je 100µl Ligand-Lösung pipettieren.
- Zur Messung der Totalaktivität werden 400µl Tracer in zwei separate Röhrchen pipettiert.
- Inkubation aller Röhrchen für 60 Min. bei Raumtemperatur (18-25°C) und horizontalem Schütteln bei mind. 300 bis 4000 UpM.
- Vollständiges Absaugen oder Dekantieren des Inhalts aller Röhrchen, außer denen zur Messung der Totalaktivität.
- Alle Röhrchen werden für 1 Min im Gamma-Counter gemessen.

ERGEBNISSE

Die meisten Gamma-Counter verfügen über eigene Auswertprogramme, mit denen der freie T4 Assay ausgewertet werden kann (RIA-Auswertprogramm).

Bei der manuellen Auswertung wird folgendermaßen vorgegangen:

- Berechnung der Mittelwerte der Counts/Minute aus den Doppelbestimmungen
- Berechnung der prozentualen Bindung der Standards, Kontrollen und Proben zu den Counts/Minute des 0-Standards nach folgender Formel:

$$\% \text{Bindung} = \frac{\text{Mittelwert Counts Std. / Ktrl./ Probe}}{\text{Mittelwert Counts } B_0} \times 100$$

Die prozentualen Bindungen der Standards werden möglichst auf Logit-Log-Papier auf der y-Achse gegen die Konzentrationen der Standards auf der x-Achse eingetragen und die Punkte durch eine Kurve verbunden. Die Ergebnisse der Kontrollen und Proben können dann aus dieser Kurve ermittelt werden.

Berechnungsbeispiel:

Beschriftung	cpm 1	cpm 2	cpm / MW	B/B0%	B/TC:%
Totalaktivität	102396	103202	102799		
Standard 0,0 pmol/L	79233	78935	79084	100	76,9
Standard 2,8 pmol/L	69556	69940	69748	88,2	67,8
Standard 9,7 pmol/L	45343	44937	45140	57,1	43,9
Standard 26,0 pmol/L	15222	15678	15450	19,5	15,0
Standard 74,0 pmol/L	3299	3017	3158	3,99	3,07

Die hier gezeigten Werte gelten ausschließlich als Beispiel.

GRENZEN DES VERFAHRENS

Die mit diesem oder einem anderen diagnostischen Kit erhaltenen Ergebnisse sollten stets im Zusammenhang mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten und anderen diagnostischen Ergebnissen verwendet und interpretiert werden.

Ikterische oder hämolysierte Proben wurden nicht getestet.

ERWARTETE NORMALWERTE

Wir empfehlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte anhand von klinisch charakterisierten Proben ermittelt.

Die u.a. Bereiche gelten nur als Richtlinie. Die folgenden Bereiche wurden in mehreren Studien bei einer Gesamtzahl von 531 euthyreoten Patienten ermittelt.

11,5 - 24,0 pmol/l (0,89 - 1,86 ng/dl)

Umrechnungsfaktor: Ergebnis in pmol/l x 0,07778 = Ergebnis in ng/dl

SPEZIFISCHE ASSAY CHARAKTERISTIKA (siehe auch „APPENDIX“)**Sensitivität :**

Die analytische Sensitivität des Assays wurde durch 20-fache Messung des 0-Standards und des 2,8 pmol/L Standards als 2-fache Standardabweichung vom Nullstandard berechnet und beträgt 0,4 pmol/L.

Spezifität:**Spezifität des monoklonalen Anti-T4-Antikörpers**

Die Spezifität des hochspezifischen, monoklonalen anti-T4-Antikörpers wurde mit I-125-markiertem T4 in einem kompetitiven RIA-Assay bestimmt.

Interferenzen in dem FT4 Assays durch verschiedene Analoga

Normales Humanserum (bestimmt als 15 pmol/L im FT4-Assay) wurde mit physiologischen und therapeutischen Konzentrationen von potentiell störenden Substanzen versehen. Die freie T4-Konzentration wurde im Assay gemessen und der Interferenz jeder Substanz im Vergleich zur freien-T4 Konzentration ermittelt.

Präzision

Die Präzision wurde aus der Intra- und Inter-Assay-Varianz ermittelt. Es wurden 3 Seren mit unterschiedlichen Konzentrationen in Mehrfachbestimmung gemessen.

Intra-Assay VK% war jeweils kleiner oder gleich 6,7%.

Inter-Assay VK% war jeweils kleiner oder gleich 6,5%.

Toleranz:

Eine Verzögerung von einer halben Stunde nach Beenden des Schüttelns und anschließendem Absaug-/Dekantiervorgang hat keinen Einfluss auf die Testergebnisse.

Kurzanleitung							
		Bo	Standard	Kontrollen	Probe	Totalaktivität	
Pipetieren:	Standard 1 (0-Std.)	µl	25				
	Standard 2 - 5	µl		25			
	Kontrolle 1 & 2	µl			25		
	Probe	µl				25	
Pipetieren:	Tracer I-125	µl	400	400	400	400	
Pipetieren :	Ligand-Lösung	µl	100	100	100	100	
Inkubieren:	Mischen oder Vortexen						
	60 Min bei RT schütteln (mindestens 300 – 400 UpM)						
Messen:	Absaugen oder Dekantieren						
	Empfohlene Meßzeit : 1 Minute						

INTRODUCTION

Thyroxine (T4) is the principal iodinated compound in the circulation. This amino-acid hormone with a molecular weight of 777 Da, exerts its biological activity primarily after deiodination to triiodothyronine (T3). T3 acts on cellular metabolism via receptors in the nucleus.(1)

Serum thyroxine is strongly bound three proteins, listed in descending order to their affinity for the hormone: Thyroxine-Binding-Globulin (TBG), Thyroxine-Binding-Pre-Albumin (TBPA) and Albumin. The concentration of hormone not bound to proteins (free T4) is therefore very low, approx. 0.03% when compared to total circulating hormone. This free hormone is responsible for biological activity.(2) Unlike in the case of total T3 and T4 concentrations, the free T4 concentration is maintained independently of changes of binding protein levels and therefore remains normal, when levels of TBG are high (congenitally, pregnancy, use of oral estrogens or contraceptive) or when TBG levels are low (congenitally, use of androgens, or salicylates, nephritic- syndrome), or again, when the binding capacity of the proteins decreases. Free T4 then shows the true thyroid status.(3)

Its concentration is abnormally high in cases of central or peripheral hyperthyroidism or following thyroxine treatment. Free T4 is abnormally low in cases of central or peripheral hypothyroidism. In certain several non-thyroidal-illness (NTI), decreased levels may also be found (Low-T4-syndrom).

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The radioimmunoassay of free thyroxine (T4) is a competition assay based on the principle of labeled antibody. Samples, controls and standards are incubated with ¹²⁵I-labeled monoclonal antibody specific for T4, as tracer, in the presence of a biotinylated analog of thyroxine (ligand) in avidin-coated tubes. There is competition between the free thyroxine of the sample and the ligand for the binding to the labeled antibody. The fraction of antibody complexed with the biotinylated ligand binds to avidin-coated tubes. After incubation, the content of tubes is aspirated and bound radioactivity is measured. A calibration curve is established and unknown values are determined by interpolation from the curve.

WARNING AND PRECAUTIONS

General remarks

- The vials with calibrators and controls should be opened as shortly as possible to avoid excessive evaporation.
- Do not mix the reagents from kits of different lots.
- A standard curve must be included with each assay.
- The correct setting of the shaker is very important for the reproducibility of the assay.
- It is recommended to perform the assay in duplicate.
- Each tube must be used only once.

Basic rules of radiation safety

The purchase, possession, utilization, and transfer of radioactive material is subject to the regulations of the country of use. Adherence to the basic rules of radiation safety should provide adequate protection:

- No eating, drinking, smoking or application of cosmetics should be carried out in the presence of radioactive materials.
- No pipeting of radioactive solutions by mouth.
- Avoid all contact with radioactive materials by using gloves and laboratory overalls.
- All manipulation of radioactive substances should be done in an appropriate place, distant from corridors and other busy places.
- Radioactive materials should be stored in the container provided in a designated area.
- A record of receipt and storage of all radioactive products should be kept up to date.
- Laboratory equipment and glassware which are subject to contamination should be segregated to prevent cross-contamination of different radioisotopes.
- Each case of radioactive contamination or loss of radioactive material should be resolved according to established procedures.
- Radioactive waste should be handled according to the rules established in the country of use.

Sodium azide

Some reagents contain sodium azide as a preservative. Sodium azide can react with lead, copper or brass to form explosive metal azides. Dispose of the reagents by flushing with large amounts of water through the plumbing system.

Materials of human origin

The materials of human origin, contained in this kit, were found negative for the presence of antibodies to HIV 1 and HIV 2, antibodies to HCV, as well as of Hepatitis B surface antigen (HBsAg). However, they should be handled as if capable of transmitting disease. No known test method can offer total assurance that no virus is present. Handle this kit with all necessary precautions.

All serum and plasma samples should be handled as if capable of transmitting hepatitis or AIDS. Waste should be discarded according to the country rules.

REAGENTS PROVIDED

The FT4 Assay contains sufficient reagents for 100 or 300 determinations.

All reagents are stable until the expiry date stated on kit, when stored at 2-8°C.

Do not mix reagents from different lots.

After reconstitution / use, the reagents are stable at 2-8°C until the expiry date of the kit.

Expiry dates printed on vial labels apply to the long-term storage of components by the manufacturer only, prior to assembly of the kit. Do not take into account.

SORB CT 100 (300) Ligand-coated tubes; ready for use.

2 (6) x 50 tubes Avidin-coated tubes for binding of the Ligand

Anti-T4 I-125 I-125-anti-T4 antibody solution; ready for use

1 (3) vial(s) each contains 45.0 ml of labelled immunoglobulin in liquid with bovine serum albumin, sodium azide (< 0.1%) and a dye.

Activity: each vial contains less than 310 kBq (on date of manufacture)

LIG Ligand; ready for use

1 (3) vial(s) contains 12.0 ml of Ligand-solution with bovine serum proteins and sodium azide (< 0.1%)

CAL Standards; ready for use

1 Set with 5 vials, each contains 0.5 ml T4 in human serum

The exact concentrations are indicated on the Quality Control data sheet.

Concentration range between 0 and ~ 75 pmol/L.

CONTROL Control 1 & 2; lyophilised

2 vials containing 0.5 ml T4 in human serum.

Reconstitute the vials with 0.5 ml distilled water, mix gently and wait 10 to 15 minutes before use.

The concentration expected is indicated on the Quality Control data sheet. Standards and control contain material of human origin. Handle these **reagents as if they were potentially infectious (see § precautions)**

MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Precision micropipette (25µl; 100µl)
- Repeating pipette (400µl)
- Orbital or platform shaker (min. 300 –350 rpm)
- Aspiration system or absorbent paper for decantation
- Gamma counter calibrated for I-125
- “Vortex” type shaker.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

The assay is performed on serum or plasma (EDTA or heparin) taken, if possible, after fasting. If the assay is to be done within 48 hours, samples are kept at 2-8°C; for longer periods, storage at –20°C is preferable. Samples stored at –20°C are thawed at room temperature, e.g. in a 20-25°C water bath. Repeated freezing and thawing is to be avoided.

ASSAY PROCEDURE**Preparation of reagents**

Reagents stored at 2-8°C must be brought to room temperature prior to use.

Do not mix the reagents from kits of different lots.

Prepare coated-tubes in duplicate for: Standard, controls and Samples.

Uncoated tubes are to be used for the total activity.

After opening and pipetting of standard and controls, the vials must be tightly capped immediately and stored at 2 – 8°C. The evaporation from open vials may influence results of further assay determinations

Test-Protocol:

- Standards, controls and samples must be assayed at the same time.
- Prepare a series of tubes in duplicate
- Add to each tube 25µl of standard, control or sample.
- Add 400µl of tracer solution.
- Prepare separately two tubes containing only 400µl of tracer in order to obtain total activity cpm (T).
- Add 100µl of ligand solution to all tubes except those for total activity
- Incubate tubes for 60 min at room temperature (18-25°C) with horizontal shaking (min. 300 to 400 rpm). The correct setting of the shaker is very important for the reproducibility of the assay.
- Aspirate or decant contents of tubes (with exception of tubes T).
- Determine radioactivity bound to tubes (B), as well as total radioactivity (T), for 1 minute in a gamma counter.

RESULTS

In case of computer assisted analysis of free T4, a special program suitable for radio-immunoassays is to be used.

Otherwise:

- Draw the standard curve on logit-log or semi-log graph by plotting the B/B0% obtained for each standard (y-axis) against the relative concentration (x-axis).
- Calculate the B/B0% of each sample and read the free-T3 concentration in pmol/L, by interpolating on the standard curve.
- Percent binding for standards, controls and samples =

$$\text{Binding \%} = \frac{\text{Mean cpm Stand./Ctrl./ Sample}}{\text{Mean cpm B0}} \times 100$$

Example of Calculation:

The values shown below only are to be considered as an example.

Marking	cpm 1	cpm 2	cpm / MV	B/B0%	B/TC:%
Total activity	102396	103202	102799		
Standard 0.0 pmol/L	79233	78935	79084	100	76.9
Standard 2.8 pmol/L	69556	69940	69748	88.2	67.8
Standard 9.7 pmol/L	45343	44937	45140	57.1	43.9
Standard 26.0 pmol/L	15222	15678	15450	19.5	15.0
Standard 74.0 pmol/L	3299	3017	3158	3.99	3.07

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

Plasma biotin concentrations of below 40 ng/mL do not interfere with the assay. In the case of patients treated with high concentrations of biotin (>5 mg/day), blood samples must be taken at least 3 hours after the last administration of biotin. The kit has not been validated on neonatal specimens. Care should be taken when interpreting the results from hemolysed or icteric samples as the method has not been tested with such samples.

EXPECTED VALUES

Laboratories should establish their own reference values. The following values were determined in several studies on 531 sera from euthyroid individuals:

11.5 - 24.0 pmol/L (0.89 - 1.86 ng/dl)

To convert pmol/L into ng/dl, multiply results by 0.7778.

ASSAY CHARACTERISTICS (see "APPENDIX")**Sensitivity**

The analytical sensitivity is defined as the concentration of free-T4 corresponding to a B/T equal to B0 minus two standard deviation obtained in 20 assays of the zero and 2.8 pmol/l standards.

This value is 0.4 pmol/L. (mean value +/- 2 S.D.)

Specificity:**Specificity of the monoclonal anti-T4 antibody**

The specificity of the monoclonal antibody was determined by a competition RIA, using I-125 labelled T4.

Interference by different analogs with assay of free T4

Pooled normal human serum (assayed as 15 pmol/L in free T4) was complemented with physiological or therapeutic concentrations of potentially interfering molecules. The free T4 concentration was measured with the kit and the interfering contribution of each substance was calculated by subtraction of the free T4 concentration obtained in the absence of the interfering molecule.

Precision

Intra-assay and inter-assay variation were determined by assaying of three sera:

Intra-assay CV% was calculated $\leq 6.7\%$.

Inter-assay CV% was calculated $\leq 6.5\%$.

Leeway:

A delay of half an hour between the stopping of shaking (end of incubation) and aspiration of the tubes does not affect the result of the assay.

Short Instruction							
			Bo	Standard	Controls	Samples	Total-activity
Pipette:	Standard 1 (0-Std.)	μl	25				
	Standard 2 - 5	μl		25			
	Control 1 & 2	μl			25		
	Samples	μl				25	
Pipette:	Tracer I-125	μl	400	400	400	400	400
Pipette:	Ligand-solution	μl	100	100	100	100	
Mix or Vortex							
Incubate:	60 min at room temperature shaking (min. 300 – 400 rpm)						
	Aspirate or Decant						
Measure:	Recommended measuring time : 1 minute						

APPENDIX**Performance characteristics**

Representative data are provided for illustration only. Performance obtained in individual laboratories may vary.

Specificity

Data on cross-reactivity with several related molecules for T4 were tested by RIA using ^{125}I -labeled hormone and separating free from bound hormone by polyethylene glycol precipitation. The results are presented in the following table:

Analog	Cross-reactivity (%)
L-thyroxine	100
D-thyroxine	33
L-3,3',5-triiodothyronine (T3)	0.8
L-3,3',5'-triiodothyronine (T3r)	10.2

Precision**Intra-assay**

Serum	S1	S2	S3
Number of determinations	25	25	25
Mean value, pM	5.17	15.31	29.46
C.V., %	10.29	3.06	3.11

EDTA-Plasma	P1	P2	P3
Number of determinations	25	25	25
Mean value, pM	3.62	14.95	51.48
C.V., %	8.47	2.87	3.20

Inter-assay

Serum	S1	S2	S3
Number of determinations	10	10	10
Mean value, pM	5.62	27.95	42.23
C.V., %	7.58	3.94	2.54

EDTA-Plasma	P1	P2	P3
Number of determinations	25	25	25
Mean value, pM	6.03	27.03	41.88
C.V., %	8.70	5.55	4.55

 ^{125}I Characteristics

$T_{1/2} (^{125}\text{I}) = 1443 \text{ h} = 60.14 \text{ d}$

^{125}I	E (MeV)	%
γ	0.035	
X	0.027	114
	0.032	25

BIBLIOGRAPHY

- DAVIS J.P. : Cellular actions of thyroid hormones. The Thyroid 6th, Edited by Braverman L.E., Utiger R.D. (1991); 190-203
- PIERCE J.G. & PARSONS T.F. Glycoprotein hormones: structure and Function. Annual Review of Biochemistry (1981) 50, 465-495
- EKINS R.P. Free hormones in blood: the concept and the measurement. Journal of Clinical Immunoassay (1984) 7, 163-180
- SURKS M.I., Chopra I.J., MARIASH N.C., NICOLOFF J.T., SOLOMON D.H. American Thyroid Association Guideline for use of laboratory tests in Thyroid Disorders. The Journal of the American Medical Association, (1990), 263, 1259-1532
- WHITERSPOON L.R., SHULER S.E.: Estimation of free thyroxine concentration: clinical method and pitfalls. J. of Clin.Immunoassay (1984) 7: SHANNON
- WOOLF P.D. :Determination of free thyroxin 192in serum by ultrafiltration: validation of a method an preliminary results. Clin.Chem. (1984) 30: 1770

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur Forschungszwecke für	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore

