

Free T3

CE

1. INTRODUCTION

L'hormone thyroïdienne, la triiodothyronine (T3), est produite par la thyroïde. L'iode est un composant important de la synthèse. La thyroxine est convertie en T3 active (trois à quatre fois plus puissante que la T4) à l'intérieur des cellules par les déiodinases (5'-iodine).

La globuline transportant la thyroxine (TGB) est la protéine porteuse de l'hormone thyroïdienne circulante.

Seule une fraction très petite de l'hormone circulante est libre, à 0,3 % (non liée) ; cette fraction est biologiquement active. La mesure de la concentration libre de triiodothyronine est donc en corrélation avec l'état clinique plutôt qu'avec les taux totaux de triiodothyronine. Par exemple, l'augmentation des taux totaux de T3 est associée à la grossesse, aux anticonceptionnels par voie orale et aux traitements aux œstrogènes ; elle entraîne des taux élevés de T3 totale tandis que la concentration de T3 libre reste inchangée.

La concentration en protéines porteuses est altérée dans de nombreux cas, comme par exemple en cas de grossesse. Lorsque la fonction thyroïdienne est normale, l'altération des concentrations en protéines porteuses fait varier la concentration totale de T3 tandis que la fraction libre reste constante.

La liaison du T3 joue un rôle fondamental dans le contrôle de retour de la thyroïde: la T3 libre (FT3) agit sur l'hypophyse afin d'inhiber la sécrétion de l'hormone thyroïdienne.

Les hormones thyroïdiennes agissent sur l'organisme de façon à augmenter le métabolisme basal, elles affectent la synthèse protéique et elles augmentent la sensibilité du corps aux catécholamines (comme l'adrénaline). Les hormones thyroïdiennes sont essentielles au développement et à la différenciation des cellules du corps humain. Ces hormones régulent de plus le métabolisme des protéines, des graisses et des carbohydrates ; elles sont impliquées dans la régulation de l'utilisation des résidus énergétiques de la part des cellules. Les stimuli physiologiques et pathologiques influencent la synthèse de l'hormone thyroïdienne. Un excès de T3 circulante provoque le syndrome clinique de la thyrotoxicose ou hyperthyroïdie. Tant la T3 que la T4 servent au traitement de l'hypothyroïdie. Certaines conditions cliniques comme la grossesse, un traitement aux œstrogènes et d'autres facteurs indépendants de la thyroïde, altèrent les concentrations de T3 et la mesure des taux de FT3 et pourraient entraîner un diagnostic erroné du fait que les taux de FT3 résultent inaltérés aux changements de la TGB.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de la triiodothyronine libre (FT3) dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

La triiodothyronine libre (FT3, antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec le T3 antigénique marqué à la peroxydase de raifort (HRP) par rapport à l'anticorps anti T3 adsorbé sur microplaque (phase solide). Après de la incubation, la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme HRP présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H_2O_2) et le substrat TMB, en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H_2SO_4). L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration de FT3 dans l'échantillon. La concentration de FT3 dans l'échantillon est calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'IgG d'Anti T3** : 12 bandes détachables enduites d'IgG d'Anti-T3 de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué T3-HRP** : 1 flacon contenant 12 ml de T3 marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de lavage (concentrée x 50)** : 1 flacon contenant 20 ml (NaCl 45 g/l; Tween-20 55 g/l)
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H_2O_2 -TMB 0.26g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Etalons T3**: 6 flacons, 1 ml chacun

Etalon 0:	0.0 pg/ml
Etalon 1:	0.4 pg/ml
Etalon 2:	1.2 pg/ml
Etalon 3:	4.5 pg/ml
Etalon 4:	8.0 pg/ml
Etalon 5:	18.0 pg/ml

Les taux exacts sont rapportés dans les étiquettes pour chaque lot spécifique.
Pour les unités SI : 1 pg/ml x 1,536 = pmol/l

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi
- 1 schéma de distribution et d'identification

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Equipement manuel ou automatique pour le rinçage des puits
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2°C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22°C – 28 °C) pour au moins 30 minutes. À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2-8 °C ; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Bandes détachables enduites

Les bandes détachables sont enduites d'anticorps d'IgG anti-T3 et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2°C et 8°C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. *Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2°C et 8°C ; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.*

6.2. Conjugué T3-HRP

Solution de conjugué T3-HRP prête à l'emploi.

6.3. Solution de lavage

Diluer la solution de lavage concentrée à 1000 ml d'eau distillée ou désionisée dans un récipient adapté. Pour de plus petits volumes, respecter le ratio de 1:50. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2°C et 8°C.

6.4. Etalons T3

Les étalons sont prêts à l'emploi. Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8° C.

6.5. Solution TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2°C et 8°C à l'obscurité. *La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.*

6.6. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2°C et 8 °C.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons peuvent être réfrigérés à 2...8°C pendant une période maximale de 48 heures. Le conserver jusqu'à 30 jours à -20° C s'il ne peut pas être testé dans les 48 heures. Éviter les congélations et décongélations répétées des échantillons. Pour des tests en double, 0,10 mL d'échantillon sont nécessaires.

7.1. Précaution

- Eviter l'exposition du TMB au rayon du soleil, aux métaux et aux oxydants. Ne pas congeler la solution.
- Un maximum de précaution est nécessaire pour l'utilisation des réactifs.

8. PROTOCOLE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement le mode d'emploi **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict du protocole. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et placer les sur le support. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter des résultats faussés. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse. Réserver au moins :

2 puits	(ex. A1+B1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. C1+D1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. E1+F1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. G1+H1)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. A2+B2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. C2+D2)	Pour l'étalon 5

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

1. Pipeter 50 µl d'étalons et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 100 µl de conjugué à la T3-HRP dilué dans chaque puits.
3. Agiter délicatement la microplaque pendant 20-30 secondes et couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure à température ambiante (22°C – 28°C).**
5. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante : pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

6. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 min à température ambiante (22°C – 28°C) à l'obscurité.**
8. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque (15 – 20 sec).
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
9. Lisez l'absorbance (E) à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le Blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide de l'étalon 0

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillons de patients dans le plan de distribution et d'identification

Il est recommandé d'utiliser une longueur d'onde de référence à 620 nm pour la lecture à double longueur d'onde.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance** pour tous les doublets, si nécessaires.

9. RESULTATS

9.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point du courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

9.2. Valeurs de Référence

Une étude de population adulte euthyroïde a été utilisée pour déterminer les valeurs prévues pour le coffret ELISA FT3.

	Moyenne (pg/ml)	SD	Plage (pg/ml)
Adultes	2,8	0,7	1,4 – 4,2
Grossesse	3,0	0,6	1,8 – 4,2

Il est important de noter que la détermination d'une gamme de valeurs attendues dans une méthode donnée pour une population de «normal» est tributaire de nombreux facteurs, tels que la spécificité et la sensibilité de la méthode en usage, et la population étudiée. Par conséquent, chaque laboratoire devrait examiner la gamme spécifiée par le fabricant comme un guide général et de produire leur propre gamme de valeurs attendues sur la base des laboratoires où la population autochtone habite

10. CONTROLE QUALITÉ

Chaque laboratoire devrait tester les contrôles avec des taux d'hypothyroïdie, d'euthyroïde et d'hyperthyroïdie pour surveiller les performances du coffret. Ces contrôles doivent être traités comme inconnus et les valeurs déterminées dans chaque session.

Les tableaux de contrôle de la qualité devraient être observés afin de suivre les prestations des réactifs fournis. Des méthodes statistiques appropriées doivent, de plus, être utilisées pour vérifier la tendance. Chaque laboratoire devrait choisir les limites d'acceptabilité des performances du coffret. Les autres paramètres incluent les interceptions à 80, 50 et 20% de la courbe d'étalonnage pour la reproductibilité inter-essai. De plus, l'absorbance maximale devrait refléter les valeurs des séances précédentes. Des déviations significatives par rapport aux prestations établies peuvent indiquer une altération inobservée des conditions expérimentales ou une dégradation des réactifs du coffret. Utiliser des réactifs frais pour déterminer les motifs des variations.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (24x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est $\leq 4,94\%$.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure (12x) de trois sérums de contrôle différents en lots différents. La variation inter dosage est $\leq 13,19\%$.

11.2. Spécificité analytique

La réactivité croisée de l'anti-triiodothyronine avec certaines substances a été déterminée en ajoutant les solutions interférentes à une matrice de sérum à diverses concentrations. La réactivité croisée a été calculée en analysant le rapport entre la concentration de substances interférentes et la concentration de triiodothyronine nécessaire pour déplacer la même quantité de conjugué.

Substance	Concentration	Réactivité croisée
I-triiodothyronine	-	1,0000
I-Thyroxine	10 µg/ml	< 0,0002
d-Thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Iodo-thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Diodo-thyroxine	10 µg/ml	< 0,0001
Acide triiodothyroacétique	10 µg/ml	< 0,0001
Phénylbutazone	10 µg/ml	< 0,0001
Salicylate de sodium	10 µg/ml	N/D
Phénytoïne	10 µg/ml	N/D
Acide oléique	10 nmol/LI	N/D
Albumine	50 mg/ml	N/D
Hémoglobine	10 µL/ml of packed red cells added to the serum	N/D

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de T3 libre par l'étalon 0 est 0,05 pg/ml avec une limite de confiance de 95%.

11.4. Interférences

Divers médicaments peuvent agir sur la liaison entre la triiodothyronine et les protéines porteuses ou sur le métabolisme de la T3, ce qui complique l'interprétation des résultats de la T3 libre.

Les autoanticorps circulants vers la T3 et les inhibiteurs liant les hormones peuvent provoquer des interférences.

La littérature spécialisée rapporte que l'héparine a des effets in vivo et in vitro sur la concentration de FT3. Aucune épreuve n'a toutefois été réalisée avec des échantillons contenant cet anticoagulant.

Dans plusieurs maladies non thyroïdiennes (NTI), il devient très difficile d'établir l'état de la thyroïde. La mesure du TSH est recommandée pour repérer les anomalies de fonctionnement de la thyroïde.

Des dysalbuminémies familiales peuvent induire des résultats erronés dans la détermination directe du dosage de la FT3.

« NE PAS UTILISER AUX FINS DU DÉPISTAGE CHEZ LES NOUVEAUX-NÉS »

11.5. Comparaison de méthode

L'ELISA de T3 libre (NovaTec) a été comparé à un coffret disponible en commerce. 151 échantillons de sérum ont été testés. La courbe de régression est :

$$(FT3 \text{ NovaTec}) = 0,923 * (FT3 \text{ RIA}) + 0,350$$

$$r^2 = 0,903$$

12. LIMITATIONS DU PROCÉDÉ

« NE PAS UTILISER AUX FINS DU DÉPISTAGE CHEZ LES NOUVEAUX-NÉS »

13. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro. Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être faite durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300^R comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.

- Il est important que le temps de réaction dans chaque puits soit constant pour la reproductibilité. Le pipetage des échantillons ne doit pas prendre plus de 10 minutes afin d'éviter toutes dérives du dosage. Si cela dure plus de 10 minutes, suivre le même ordre d'utilisation. Si plusieurs plaques sont utilisées, il est recommandé de répéter la courbe dose/réponse dans chaque plaque.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- La méthode ELISA de NovaTec est destinée à un personnel qualifié qui est familiarisé avec les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

AVERTISSEMENT:	L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Garder hors de la portée des enfants. En cas de contact avec les yeux, rincer soigneusement avec de l'eau et consulter un médecin !
-----------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

13.1. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

14. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV051

Free T3 (96 Dosages)