

NovaLisa[®]

Free T4

ELISA

CE

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

La thyroxine (T4; 3,3',5,5'-tétraiodo-L-thyronine) est voisine de la triiodothyronine (T3), l'hormone thyroïdienne la plus importante chez les mammifères sécrétée dans le sang par la glande thyroïde. Les hormones thyroïdiennes jouent un rôle essentiel dans la régulation du taux métabolique, des fonctions cardiaques et digestives, du contrôle musculaire, du développement cérébral et du maintien des os. T4 et T3 sont des partenaires importants pour de nombreuses autres hormones telles que l'insuline, le glucagon, la noradrénaline et l'adrénaline. Ils sont essentiels pour divers processus métaboliques tels que la régulation de l'équilibre thermique et pour favoriser la croissance, en particulier du système nerveux et du squelette, dans le développement de l'embryon et de l'enfant.

La T4 est produite par les cellules folliculaires de la glande thyroïde et liée à la protéine thyroglobuline (Tg). La production et la libération des hormones thyroïdiennes, T3 et T4, sont contrôlées par un système de boucle de rétroaction impliquant l'hypothalamus, ainsi que les glandes pituitaires et thyroïdiennes. L'hypothalamus sécrète de la thyrotrophine (TRH) qui stimule la glande pituitaire à produire de la thyrostimuline (TSH). La TSH stimule à son tour la production des hormones thyroïdiennes. Ce système de production d'hormones est régulé par une boucle de rétroaction négative: des niveaux croissants de T3 et de T4 empêchent la libération de TRH et de TSH. Ce système permet au corps de maintenir un niveau constant d'hormones thyroïdiennes.

La plupart des hormones thyroïdiennes circulant dans le sang sont liées aux protéines de transport (principalement à la globuline liant la thyroxine, TBG) et seule une très petite fraction des hormones en circulation est libre (non liée) et biologiquement active. Par conséquent, la mesure de la thyroxine totale peut être trompeuse, alors que la mesure des concentrations de T3 / T4 libre présente une grande valeur diagnostique.

2. INDICATION D'UTILISATION

La trousse Free T4 ELISA est prévue pour la détection quantitative de la T4 libre (Thyroxine) dans le sérum et le plasma (citrate, héparine) humains.

3. PRINCIPE DU TEST

La détermination immunoenzymatique quantitative de la T4 libre est basée sur la technique ELISA compétition (du anglais, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Les Microplaques sont recouvertes d'anticorps spécifiques anti-T4. La T4 libre dans l'échantillon entre en compétition avec la T4 conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) pour la liaison de l'anticorps. Par la suite, les puits sont lavés pour éliminer tout matériau non lié. Les complexes immunologiques sont visualisés en ajoutant du substrat de tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne un produit de réaction bleu. L'intensité de ce produit est inversement proportionnelle à la quantité de T4 libre dans l'échantillon. L'acide sulfurique est ajouté pour arrêter la réaction. Cela produit un changement du bleu au jaune. L'absorbance à 450/620 nm est lue en utilisant un lecteur de microplaques ELISA.

4. MATERIEL

4.1. Réactifs fournis

- **Microplaque:** 12 barrettes de 8 puits sécables revêtus d'anticorps anti-T4; en sachets d'aluminium refermables.
- **Solution d'arrêt:** 1 flacon contenant 15 mL d'acide sulfurique, 0,2 mol/L; prêt à l'emploi; bouchon rouge.
- **Tampon de lavage (concentré x 20):** 1 flacon contenant 50 mL d'un tampon phosphaté (0,2 M) concentré 20 fois (pH 7,2 ± 0,2) pour laver les puits; bouchon blanc.
- **Conjugué:** 1 flacon contenant 15 mL T4 conjuguées à la peroxydase; prêt à l'emploi; couleur rouge, bouchon noir.
- **Solution de substrat TMB:** 1 flacon contenant 15 mL de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), < 0,1 %; prêt à l'emploi; bouchon jaune; < 5 % NMP (pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 12.1).
- **Contrôle:** 1 flacon contenant 1 mL; de couleur marron clair; prêt à l'emploi, bouchon blanc.
- **Étalons:** 6 flacons contenant chacun 1 mL étalon; de couleur marron clair; prêt à l'emploi, bouchon jaune.

Étalon A:	0	ng/L
Étalon B:	4	ng/L
Étalon C:	10	ng/L
Étalon D:	20	ng/L
Étalon E:	35	ng/L
Étalon F:	75	ng/L

Pour les substances potentiellement dangereuses s'il vous plaît vérifiez la fiche de données de sécurité.

4.2. Matériel fourni

- 1 couvercle autocollante
- 1 instructions d'utilisation
- 1 présentation de la plaque

4.3. Matériel et équipement requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620 nm
- Incubateur 37°C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des puits
- Pipettes pour utilisation entre 50 et 100 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Conserver le kit à 2...8 °C. Les réactifs ouverts sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette lorsqu'il est conservé à 2...8 °C. Les étalons peuvent être conservés jusqu'à 6 mois après leur ouverture.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important porter tous les réactifs et échantillons à température ambiante (20... 25 °C) et les mélanger avant de commencer le test!

6.1. Microplaque

Les barrettes sécables sont revêtues d'anticorps anti-T4. Immédiatement après avoir prélevé les barrettes nécessaires, les barrettes restantes doivent être scellées le vide dans de feuille d'aluminium avec le sac de silicium (le déshydratant) fourni et emmagasiner à 2...8 °C.

6.2. Tampon de lavage (conc. x 20)

Diluer la Tampon de lavage 1+19; par exemple 10 mL de la Tampon de lavage + 190 mL d'eau distillée. L'échantillon de tampon diluée est stable pendant 5 jours à la température ambiante (20...25 °C). Cas apparaissent des cristaux dans le concentré, chauffer la solution à 37 °C par exemple dans un bain-marie mélangez bien avant dilution.

6.3. Étalons

Les étalons sont prêtes à être utilisés. Ils sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette. Ils sont encore stables pendant 6 mois lorsqu'ils sont conservés à 2...8 °C; mais pas plus longtemps que la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

6.4. Solution de substrat TMB

La solution est prête à utiliser et doit être emmagasiné à 2...8 °C, à l'abri de la lumière. La solution doit être incolore ou pourrait avoir une légère couleur bleu clair. Si le substrat devient bleu, il peut avoir été contaminé et ne peut pas être utilisé dans le test.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Utiliser des échantillons humains de sérum ou plasma (citrate, héparine) pour ce test. Si le test est réalisé dans les 5 jours après le prélèvement, les échantillons doivent être conservés à 2...8 °C; autrement ils doivent être aliquotés et conservés surgelés (-70...-20 °C). Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le test. Éviter les cycles répétés de congélation et décongélation. L'inactivation par la chaleur des échantillons n'est pas recommandée.

8. PROCÉDE DE TEST

8.1. Préparation du test

Lire attentivement les instructions d'utilisation **avant de** réaliser le test. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. La technique de test suivante a été validée uniquement pour une procédure manuelle. Si le test doit être effectué sur un système automatique pour ELISA, nous conseillons d'augmenter le volume du Tampon de lavage de 300 à 350 µL. Faites attention au chapitre 12. Avant de commencer le test, le plan de distribution et d'identification de tous les échantillons et les étalons/contrôles (il est recommandé de déterminer en double) doivent être soigneusement établis sur la feuille de présentation de la plaque prévue dans le conseil de kit. Sélectionner le nombre de barrettes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réaliser toutes les étapes du test dans l'ordre donné et sans délai.

Un embout de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque étalon/contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

1. Pipeter 50 µL de étalons/contrôles et d'échantillons dans leurs puits respectifs.
2. Pipeter 100 µL du conjugué dans tous les puits.
3. Couvrir les puits avec le couvercle, fourni dans le kit.
4. **Incuber pendant 1 heure \pm 5 minutes à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.** Non esporre a fonti di luce diretta.
5. A la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits cinq fois avec 300 µL du Tampon de lavage. Éviter les débordements des puits de réaction. L'intervalle entre le cycle de lavage et l'aspiration doit être > 5 sec. À la fin, enlever soigneusement le liquide restant en tapotant les barrettes sur du papier absorbant avant la prochaine étape.

Note: L'étape de lavage est très importante! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et de faux résultats !

6. Pipeter 100 µL de la solution de substrat TMB dans tous les puits.
7. **Incuber pendant exactement 15 minutes à température ambiante ($20...25^\circ\text{C}$) dans l'obscurité.** Une couleur bleue se produit en raison d'une réaction enzymatique.
8. Pipeter 100 µL de la solution d'arrêt dans tous les puits dans le même ordre et à la même vitesse que pour la solution de substrat TMB, ainsi, il y a un changement du bleu au jaune.
9. Mesurer l'absorbance à 450/620 nm dans les 30 minutes après l'addition de la solution d'arrêt.

8.2. Mesure

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque étalon/contrôle et échantillon dans la présentation de la plaque.

Il est recommandé d'effectuer la mesure **dichromatique** utilisant 620 nm comme longueur d'onde de référence.

Si doubles déterminations ont été effectuées, calculer **les valeurs moyennes d'absorbance**.

9. RESULTATS

9.1. Critères de validation

Afin de valider le test, les critères suivants doivent être respectés:

- **Étalon A:** Valeur d'absorbance $> 1,000$ et $> \text{Standard B}$
- **Étalon B** Valeur d'absorbance $> \text{Étalon C}$
- **Étalon C** Valeur d'absorbance $> \text{Étalon D}$
- **Étalon D:** Valeur d'absorbance $> \text{Étalon E}$
- **Étalon E:** Valeur d'absorbance $> \text{Étalon F}$
- **Étalon F::** Valeur d'absorbance $< 0,200$
- **Contrôle:** Résultats en ng/L dans l'intervalle indiquée sur l'étiquette

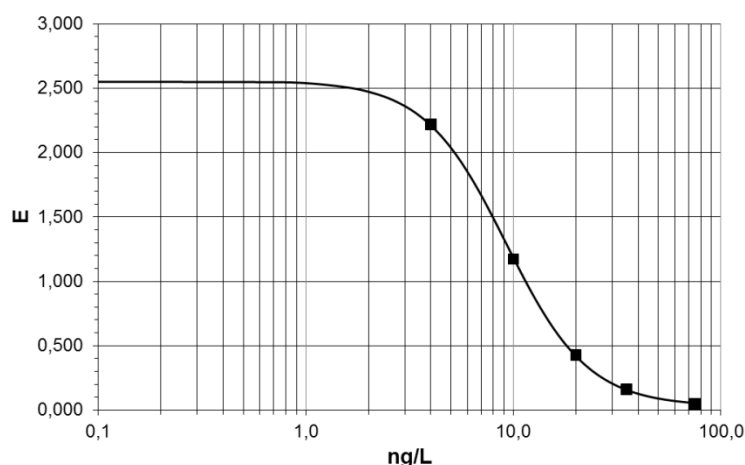
Étalon A $>$ Étalon B $>$ Étalon C $>$ Étalon D $>$ Étalon E $>$ Étalon F

Lorsque ces critères ne sont pas remplis, le test n'est pas valide et doit être recommencé.

9.2. Calcul des résultats

Afin d'obtenir des **résultats quantitatifs en ng/L**, tracer les valeurs d'absorbance (moyennes) des étalons A-F (axe linéaire y) par rapport à leurs concentrations correspondantes (axe des x logarithmique) et tracer la courbe de meilleur ajustement (par exemple Logistique à quatre paramètres) à travers les points tracés. Lisez les résultats de cette courbe standard en utilisant les valeurs d'absorbance (moyennes) de chaque échantillon et contrôle.

9.3. Courbe d'étalonnage Standard



9.4. Interprétation des résultats

Les intervalles de mesures normales pour ce test ELISA doivent être établies par chaque laboratoire sur la base de ses propres populations de patients dans les zones géographiques desservies.

Les résultats du test doivent être vérifiés pour tout l'état clinique du patient. De plus, chaque décision thérapeutique doit être prise individuellement.

Le diagnostic d'une maladie ne doit pas être établi sur la base d'un seul résultat de test. Un diagnostic précis doit prendre en compte de l'historique clinique, de la symptomatologie et des résultats de laboratoire.

9.4.1. Normale Mesure

Un total de 173 échantillons d'adultes apparemment en bonne santé et âgés de 18 à 68 ans ont été analysés afin d'établir l'intervalle de référence pour le Free T4 ELISA conformément à la directive approuvée CLSI protocole EP28-A3c. La plage de référence du test Free T4 ELISA a été trouvée entre **7- 22 ng/L** sur la base de la distribution centrale de 95 % de la fréquence. La valeur moyenne, l'écart type et la plage attendue sont les suivants:

	Valeur moyenne (ng/L)	SD	Intervalle (ng/L)
Adultes (n=173)	11,10	5,27	7-22

9.4.2. Échantillons de femmes enceintes

Des échantillons de femmes enceintes apparemment en bonne santé ont été utilisés pour déterminer les valeurs de T4 libre attendues pour le test Free T4 ELISA pendant la grossesse. La valeur moyenne, l'écart type et la plage attendue sont les suivants:

	Valeur moyenne (ng/L)	SD	Intervalle (ng/L)
Femmes Enceintes (n=30)	10,03	2,19	6-16

10. PERFORMANCES DU TEST

Ces résultats s'appuient sur les groupes d'échantillons étudiés; il n'agit pas de caractéristiques techniques garanties.

Pour plus d'informations sur les performances du test s'il vous plaît contactez NovaTec Immundiagnostica GmbH.

10.1. Précision

<u>Intra-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (E)</u>	<u>CV (%)</u>
# 1	24	2,086	2,69
# 2	24	1,337	5,47
# 3	24	0,224	6,28
<u>Inter-essai</u>	<u>n</u>	<u>moyenne (ng/L)</u>	<u>CV (%)</u>
# 1	12	11,18	6,68
# 2	12	24,29	4,55
# 3	12	36,96	3,99

10.2. Sensibilité Analytique

La limite de détection (LoD) du test Free T4 ELISA est de 1,06 ng/L, déterminée conformément aux recommandations du CLSI protocole EP17- A2, sur la basée sur les proportions de faux positifs (α) inférieurs à 5% et de faux négatifs (β) inférieurs à 5%; en utilisant 240 déterminations, avec 120 échantillons non analysés et 120 échantillons à faible niveau concentration; et une limite du blanc (LoB) de 0,00 ng/L.

10.3. Spécificité Analytique

10.3.1. Réaction croisée

Les substances suivantes, lorsqu'elles sont testées dans des échantillons à des concentrations de T4 libres d'env. 10 ng/L et 25 ng/L, conformément au protocole EP07-A2 du CLSI, n'ont provoqué aucune réactivité croisée jusqu'aux concentrations indiquées dans le tableau ci-dessous:

Substance Testée	Test Concentration [ng/L]	Réactivité croisée [%]
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (T3)	10 000	< 0,060
3,3',5'-Trijodo-L-thyronin (Reverse T3)	100 000	< 0,001
3,5-Dijodo-L-thyronin (3,5-T2)	50 000	< 0,001
3,3',5'-Triiodothyroacetic Acid	10 000	< 0,010
3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic Acid	100 000	< 0,001

10.3.2. Interférences

Les substances suivantes n'ont montré aucune interférence aux concentrations indiquées lors d'essais dans des échantillons présentant des concentrations de T4 libre d'environ 10 ng/L et 25 ng/L conformément au protocole EP07-A2 du CLSI. Un biais inférieur à 10 % * n'est pas considérée comme une interférence significative.

Substance Testée	Test Concentration
Bilirubine	200 µg/mL
Hémoglobine	2 mg/mL
Triglycerides	35 mg/mL
Albumine	63 mg/mL

* limite supérieure de l'intervalle de confiance de 95 %

L'étude d'un panel d'échantillons présentant un facteur rhumatoïde n'a pas permis de mettre en évidence de forte augmentation ou de diminution des taux de T4 libre faussement élevés en raison d'une interférence. Cependant, dans les essais immunologiques à base d'hormones libres, une interférence causée par des facteurs rhumatoïdes doit être envisagée.

10.4. Corrélation

Le test Free T4 ELISA a été comparé à un autre teste immunologique. 130 échantillons (les valeurs allaient d'environ 1 ng/L à environ 40 ng/L) ont été utilisés. La courbe de régression linéaire a été calculée.

$$y = 0,973 + 0,145x$$

$$R^2 = 0,917$$

10.5. Intervalle de mesure

L'intervalle de mesure est 1,06 ng/L – 75 ng/L.

11. LIMITES DE LA TECHNIQUE

Une contamination bactérienne ou des cycles de congélation/décongélation répétés de l'échantillon peuvent affecter les valeurs d'absorption.

12. 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 le bien-fondé, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de test, l'information, les précautions et mises en garde de la notice d'emploi, doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces trousse avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de test, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont pas autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces motifs. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro.
- Tous les matériaux d'origine humaine ou animale doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été trouvés non réactifs en Ag HBs, en anticorps anti-VHI 1 et 2 et en anticorps anti-VHC.
- Ne pas échanger les réactifs ou les barrettes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de cette trousse.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des embouts de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée.
- Fermer soigneusement les flacons après utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de étalon/contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et les réactifs exactement au fond des puits sans éclabousser.
- Le ELISA est uniquement destinée à l'utilisation par un personnel compétent, maîtrisant parfaitement les techniques de travail.

12.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant de la NMP

La Solution de substrat TMB contient NMP.

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Danger



H360D
P280

Peut nuire au fœtus.

Porter des gants de protection/ des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux.

P308 + P313

EN CAS d'exposition prouvée ou suspectée: consulter un médecin.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

12.2. 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.

13. INFORMATION POUR LES CAMMANDES

Référence:

FT41050

Free T4 ELISA (96 déterminations)