

Instructions for use

Reverse T3 (rT3) ELISA

Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Reverse Triiodothyronine (rT3) in human serum and plasma by an enzyme immunoassay.

PRINCIPLE OF THE TEST

The rT3 ELISA is a competitive enzyme immunoassay, where the antigen (rT3 present in standards, controls and patient samples) competes with a biotin-labelled antigen (rT3-Biotin conjugate) for a limited quantity of antibody which is coated on the microplate wells. After one hour incubation followed by the first washing, unbound materials are removed and a Streptavidin-HRP conjugate is added and incubated for 30 minutes. Following a second washing, the TMB substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution, upon which the color intensity is measured with a microplate reader. The color intensity is inversely proportional to the concentration of rT3 in the sample. The set of kit standards that are run simultaneously with the samples is used to plot a standard curve and determine the concentration of rT3 in samples and controls.

CLINICAL APPLICATIONS

3,3',5'-Triiodo-L-thyronine also known as reverse triiodothyronine or reverse T3 (rT3) differs from 3,3',5'-Triiodo-L-thyronine (T3) in the positions of the iodine atoms in the molecule. The majority of circulatory rT3 is synthesized by peripheral deiodination of thyroxine (T4).

Both T3 and rT3 bind to thyroid hormone receptors, but in contrast to T3, rT3 has not been found yet to stimulate receptor metabolic activity; it blocks receptor sites from T3 activation. The ratio of rT3 to T3 is a valuable biomarker of the metabolism and function of thyroid hormones because the process of 5' monodeiodination that converts T4 to T3 and rT3 to 3,3'-T2 is inhibited in a number of non-thyroidal conditions such as fasting, anorexia nervosa, malnutrition, diabetes mellitus, stress, severe trauma or infection, hemorrhagic shock, hepatic dysfunction, pulmonary diseases and others. This scenario is known as "Sick euthyroid" syndrome or "Low T3" syndrome.

An elevated ratio of rT3 over T3 is therefore indicative of "sick euthyroid" syndrome and helps to exclude a diagnosis of hypothyroidism, particularly in critically ill patients 1-9.

The concentration of rT3 could be high in patients on the following medications: amiodarone, dexamethasone, propylthiouracil, ipodate, propranolol, and the anesthetic halothane. The concentration of rT3 could be low in patients on Dilantin, which decreases rT3 due to its displacement from thyroxine-binding globulin and therefore generates an excessive clearance of rT3.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. This kit is intended for in vitro use only.
2. Practice good laboratory practices when handling kit reagents and specimens. This includes:
 - Do not pipette by mouth.
 - Do not smoke, drink, or eat in areas where specimens or kit reagents are handled.
 - Wear protective clothing and disposable gloves.
 - Wash hands thoroughly after performing the test.
 - Avoid contact with eyes; use safety glasses; in case of contact with eyes, flush eyes with water immediately and contact a doctor.
3. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
4. Avoid microbial contamination of reagents.
5. A standard curve must be established for every run.
6. It is recommended to all customers to prepare their own control materials or serum pools which should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
7. The controls (included in kit) must be included in every run and their results must fall within the ranges stated in the quality control certificate; a failed control result might indicate improper procedural techniques or pipetting, incomplete washing or inadequate reagent storage.
8. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
9. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of specimens.
10. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the control do not reflect established ranges.
11. When reading the microplate, the presence of bubbles in the wells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
12. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
13. The Biotin-rT3 conjugate solution is sensitive to light and should be of a light yellow color if stored properly; do not use if the solution appears dark green or black in color.

14. When dispensing the substrate and stopping solutions, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
15. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
16. Do not use kit components from different kit lots within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
17. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to local and/or national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of rT3 in human serum and plasma. The kit is not calibrated for the determination of rT3 in other specimens of human or animal origin.
2. Do not use grossly haemolysed, lipemic, icteric or improperly stored serum or plasma samples.
3. Samples or control sera containing azide or thimerosal are incompatible with this kit and will lead to false results.
4. Do not use the results of this kit as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, medications and heterophilic antibodies (in patients exposed to animals or animal products) can interfere with immunoassays. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of patients background including the frequency of exposure to animals/ products and medications.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS

POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. No test method however, can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any other infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions applied to blood specimens. All human specimens should be considered a potential bio- hazard and handled as if capable of transmitting infections and in accordance with good laboratory practices.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Serum:

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4–5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer.

Plasma:

Approximately 0.2 ml of plasma is required per duplicate determination. Collect 4–5 ml of blood into EDTA plasma tubes. Centrifuge and carefully remove the plasma layer.



Do not test samples the same day of the blood draw. The serum or plasma specimen samples must be stored at the recommended storage conditions for at least 20 hours prior to being tested.

Upon serum or plasma collection, the samples must be stored:

- a) Refrigerated (2–8°C) for a period of no longer than 5 days, or
- b) Frozen ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) for a period of no longer than 3 months.

Avoid multiple freeze/thaw cycles.

Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take precautions when handling.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipette to dispense 25, 50, 100, 150 and 350 μl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Microplate shaker

Recommendation: Orbital (3 mm diameter) set to 600 rpm

Note: Other shakers may be used, provided the test results obtained with those shakers can meet the kit QC certificate criteria and the criteria of any end-user controls.

5. Microplate reader with a filter set at 450 nm and an upper OD limit of 3.0 or greater
6. Microplate washer (recommended)

REAGENTS PROVIDED

1. AA E-0030 WASH-CONC 10x **Wash Buffer Concentrate** – Requires Preparation **X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
 Volume: 50 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
 Preparation: Dilute the Wash Buffer concentrate 1:10 in distilled or deionized water to prepare the working wash buffer. If one whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

2. AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in buffer.
 Volume: 16 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

3. AA E-0080 STOP-SOLN **Stopping Solution** - Ready To Use.

Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.
 Volume: 6 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

Hazards
 identification:



H315 Causes skin irritation.
 H319 Causes serious eye irritation.

4. Standards and Controls- Ready To Use.

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration*	Volume/Vial
TF E-2501	STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1 ml
TF E-2502	STANDARD B	Standard B	0.02 ng/ml	1 ml
TF E-2503	STANDARD C	Standard C	0.1 ng/ml	1 ml
TF E-2504	STANDARD D	Standard D	0.4 ng/ml	1 ml
TF E-2505	STANDARD E	Standard E	1 ng/ml	1 ml
TF E-2506	STANDARD F	Standard F	2 ng/ml	1 ml
TF E-2551	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for acceptable range!	1 ml
TF E-2552	CONTROL 2	Control 2		1 ml

*Approximate value — please refer to vial labels for exact concentrations

Contents: rT3 in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with rT3 to the concentrations in labels/QC certificate.

Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label.

5. TF E-2531 96 **Anti-Reverse T3 Polyclonal Antibody-Coated Break-Apart Well Microplate** - Ready To Use.

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microplate in a resealable pouch with desiccant.
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.

- 6. TF E-2510** **BIOTIN-AB** **Reverse T3-Biotin Conjugate** - Ready To Use.
 Contents: Reverse T3-Biotin conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 13 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months or as indicated on label.
- 7. TF E-2540** **CONJUGATE** **Streptavidin - Horse Radish Peroxidase (HRP) Conjugate** - Ready To Use.
 Contents: Streptavidin-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
 Volume: 20 ml/bottle
 Storage: Refrigerate at 2 - 8 °C
 Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment: Refer to **SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE** section.

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1.	After all kit components have reached room temperature, mix gently by inversion. Prepare the working wash buffer (see wash buffer concentrate under the section REAGENTS PROVIDED).
2.	Remove the required number of strips from the microplate and assemble into a plate frame. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3.	Pipette 25 µl of each standard, control and specimen sample (serum or plasma) into correspondingly labelled wells in duplicate.
4.	Pipette 100 µl of the Reverse T3-Biotin conjugate into each well. (The use of a multichannel pipette is recommended.)
5.	Incubate the microplate on a microplate shaker** for 1 hour at room temperature.
6.	Wash the wells with 350 µl/well of working wash buffer solution 3 times . After washings tap the plate firmly against absorbent paper to remove any residual liquid. The use of an automatic strip washer is strongly recommended. The accuracy of this assay depends on the correct execution of the washing procedure.
7.	Pipette 150 µl of the Streptavidin-HRP conjugate into each well. (The use of a multichannel pipette is recommended.)
8.	Incubate the microplate on a microplate shaker** for 30 minutes at room temperature.
9.	Wash the wells 3 times using the same procedure as stated in step 6.
10.	Pipette 150 µl of the TMB substrate into each well at timed intervals. (The use of a multichannel pipette is recommended.)
11.	Incubate the microplate on a microplate shaker** for 10-20 minutes at room temperature or until Standard A attains dark blue colour for desired OD.
12.	Pipette 50 µl of Stopping Solution into each well at the same timed intervals as in step 10 (the use of a multichannel pipette is recommended). Gently shake the microplate by hand for ten seconds to ensure complete mixing of the stopping solution in the wells.
13.	Measure the absorbance at 450 nm with a microplate reader, within 20 minutes after addition of the stopping solution.
** See REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED (#4).	

CALCULATIONS

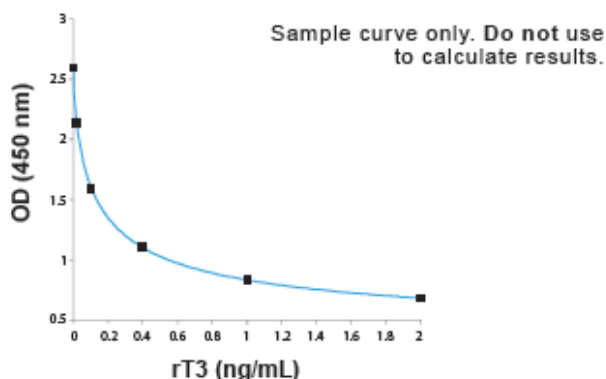
- Calculate the mean optical density of each standard, control and specimen sample duplicate.
- Use a 4-parameter or 5-parameter curve with immunoassay software to generate the control and sample concentration results or draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentration on the X-axis and read the concentration of controls and samples off the standard curve.
- If a sample reads greater than 2 ng/ml then dilute it with Standard A at a dilution of no more than 1:5. The result obtained must be multiplied by the dilution factor.
- To convert from ng/ml to ng/dl multiply the result by 100; to convert to nmol/l multiply the ng/dl result by 0.01536 or the ng/ml result by 1.536.

TYPICAL TABULATED DATA

Sample data only. **Do not** use to calculate results.

Standard	rT3 (ng/ml)	Mean OD (450 nm)
A	0	2.527
B	0.02	2.232
C	0.1	1.563
D	0.4	0.785
E	1	0.431
F	2	0.270
Unknown	0.15	1.289

TYPICAL STANDARD CURVE



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of at least 60 samples of the blank and a low value sample in two independent experiments and it was calculated as follows:

$LoD = \mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S$, where σ_B and σ_S are the standard deviation of the blank and low value sample and μ_B is the mean value of the blank.

The Limit of Detection (LoD) was determined to be **0.014 ng/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with rT3 cross-reacting at 100%:

Steroid	% Cross Reactivity
rT3	100
T3	0
T4	< 0.1
T2	0

INTERFERENT SUBSTANCES

The following substances did not show significant interference with the assay: haemoglobin up to 2 g/l, free and conjugated bilirubin up to 200 mg/l, triglycerides up to 5.0 mg/ml and Biotin up to 2.4 µg/ml.

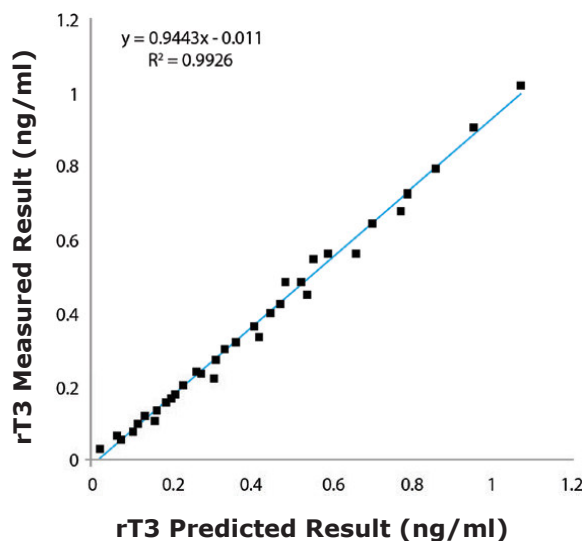
PRECISION

The experimental protocol used a nested components-of-variance design with 2 testing days, two lots and five scientists per day, each scientist ran 2 tests (one test with each lot) per day, and two replicate measurements per run (a 2 x 5 x 2 x 2 design) for each sample. The results were analyzed with a two-way nested ANOVA and summarized in the table below.

Sample	Mean (ng/ml)	Within Run SD	Within Run CV (%)	Total SD	Total CV (%)
1	0.233	0.01	3.6	0.02	7.0
2	0.535	0.01	2.4	0.05	9.5
3	1.174	0.06	4.9	0.13	10.7
4	0.102	0.01	6.0	0.01	10.4
5	0.082	0.00	5.8	0.01	8.7
6	0.094	0.01	8.1	0.01	11.5
7	0.257	0.01	4.3	0.02	9.7
8	0.480	0.02	4.2	0.04	9.2

LINEARITY

The linearity study was performed with four human serum samples covering the range of the assay and following CLSI guideline EP6-A. The samples were diluted in Standard A up to a 1:5 dilution, tested in duplicate, and the results compared to the predicted concentration. The statistical analysis shows that the assay is sufficiently linear.



COMPARATIVE STUDIES

The rT3 ELISA kit (y) was tested manually, as well as with automated technology. The comparison of 40 samples yielded the following linear regression results:

$$y = 0.8452x + 0.0195, r = 0.96$$

REFERENCES VALUES

References values were obtained from commercial human specimens and calculated using a non-parametric method. Each laboratory must establish the range of reference values for their own population.

Group	N	Median (ng/ml)	95 % Range (ng/ml)	Total Range (ng/ml)
Serum	120	0.15	0.098 - 0.218	0.069 - 0.262
Plasma	120	0.15	0.098 - 0.26	0.072 - 0.309














REFERENCES

- van den Beld AW, et al. Thyroid Hormone Concentrations, Disease, Physical Function and Mortality in Elderly Men. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(1):6403 –9.
- Holtorf K. Thyroid Hormone Transport into Cellular Tissue. Journal of Restorative Medicine. 2014; 3(1):53–68.
- Holtorf K Peripheral Thyroid Hormone Conversion and Its Impact on TSH and Metabolioc Activity. Journal of Restorative Medicine. 2014; 3(1):30 –52.
- Senese R et al. Thyroid: Biological Actions of “Non-classical” Thyroid Hormones. J Endocrinol. 2014; 221(2):R1–12.
- Warner MH, Beckett GJ. Mechanisms Behind the Non- thyroidal Illness Syndrome: An Update. J Endocrinol. 2010; 205(1):1–13.
- Peeters RP, et al. Tissue Thyroid Hormone Levels in Critical Illness. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(12):6498–507.
- Friberg L, et al. Association Between Increased Levels of Reverse Triiodothyronine and Mortality after Acute Myocardial Infarction. Am J Med. 2001; 111(9):699–703.
- Pimentel, CR et al. Reverse T3 as a Parameter of Myocardial Function Impairment in Heart Failure. Int J Cardiol. 2010; 145(1):52–3.
- Economidou F, et al. Thyroid Function During Critical Illness. Hormones (Athens). 2011; 10(2):117–24.
- Thyroid Hormone Transport. National Academy of Hypothyroidism. <https://www.nahypothyroidism.org/thyroid-hormone-transport/#reverseT3>

CHANGE HISTORY

Previous Version:	6.0	New Version:	6.0a
Changes:	REAGENTS PROVIDED Hazard labelling for component AA E-0080 updated		

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Use-by date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE marking of conformity
	Caution		Catalogue number		Distributor
	Date of manufacture				

VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von Reverse-Triiodthyronin (rT3) in menschlichem Serum und Plasma durch Enzymimmunoassay.

Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entstehen zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem biotinmarkierten Antigen (rT3 Biotin Conjugate).

Nach einer Stunde Inkubation wird durch den ersten Waschschriff ungebundenes Material entfernt. Das Streptavidin-HRP wird hinzugefügt und für 30 Minuten inkubiert. Nach dem folgenden zweiten Waschschriff wird TMB-Substrate hinzugegeben.

Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von rT3 in der Probe.

Die Konzentration von rT3 in den Kontrollen und Proben kann direkt aus der Standardkurve, die aus den Standards gebildet wird, abgelesen werden.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

3,3',5'-Trijod-L-Thyronin – auch bekannt als reverses Trijodthyronin oder reverse T3 (rT3) – unterscheidet sich vom 3,3',5'-Trijod-L-Thyronin (T3) durch die Position der Jodatome im Molekül. Der Großteil des zirkulierenden rT3 entsteht durch periphere Dejodierung des Thyroxins (T4).

Sowohl T3 als auch rT3 binden an Rezeptoren für Schilddrüsenhormone – aber im Gegensatz zum T3 konnte für rT3 noch nicht nachgewiesen werden, dass es die metabolische Aktivität des Rezeptors stimuliert; es verhindert T3-Aktivierung indem es Rezeptorstellen blockiert. Der Quotient rT3 zu T3 ist ein nützlicher Biomarker für den Metabolismus und die Funktion der Schilddrüsenhormone, da der Prozess der 5'-Monojodierung, in dem T4 in T3 und rT3 in 3,3'-T2 umgewandelt werden, durch eine Vielzahl von nicht-thyreoidalen Einflussfaktoren wie Fasten, Anorexia Nervosa, Fehlernährung, Diabetes mellitus, Stress, ernsthafte Traumata oder Infektionen, Hämorrhagischer Schock, Leberfunktionsstörung, Lungenkrankheiten und andere gehemmt wird.

Dieses Szenario ist bekannt als Euthyroid-Sick-Syndrom oder Low T3 syndrome.

Ein erhöhtes Verhältnis rT3 zu T3 ist daher ein Hinweis auf ein Euthyroid-Sick-Syndrom und hilft damit eine Diagnose auf Hyperthyreismus auszuschließen, besonders bei kritisch-erkrankten Patienten.

Die Konzentration an rT3 kann bei Patienten mit folgender Medikation erhöht sein:

Amiodaron, Dexamethason, Propylthiouracil, Iodate, Propranolol und dem Anästhetikum Halothan. Die Konzentration an rT3 kann bei Patienten unter Dialantion-Behandlung niedrig sein, da es rT3 vom Thyroxin-bindenden Globulin verdrängt und dadurch einen übersteigerten Abbau des rT3 hervorruft.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

1. Dieses Kit ist nur für den *in-vitro* Gebrauch bestimmt.
2. Halten Sie die folgenden Regeln beim Umgang mit Testreagenzien und Proben ein (GLP):
 - Nicht mit dem Mund pipettieren
 - In Bereichen, in denen Proben oder Bestandteile des Kits gehandhabt werden, nicht rauchen, trinken oder essen.
 - Schutzkleidung und Einmalhandschuhe tragen.
 - Nach der Durchführung des Tests die Hände gründlich waschen.
 - Augenkontakt vermeiden; Schutzbrille tragen; bei Kontakt sofort mit Wasser spülen und einen Arzt aufsuchen.
3. Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
4. Vermeiden Sie mikrobielle Kontamination von Reagenzien.
5. Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
6. Es wird empfohlen eigene Kontrollmaterialien oder Serumpools mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einzubeziehen.
7. Die im Kit enthaltenen Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb der angegebenen Vertrauensgrenzen liegen. Eine Kontrolle außerhalb der angegebenen Vertrauensgrenzen kann auf unsachgemäße Verfahrenstechnik oder unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen oder unsachgemäße Lagerung hindeuten.
8. Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
9. Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchmischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.

10. Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
11. Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
12. Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
13. Das Biotin rT3 Konjugat ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung leicht gelblich sein. Ist die Lösung dunkelgrün oder schwarz verfärbt, sollte diese nicht mehr verwendet werden.
14. Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
15. Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
16. Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
17. Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

1. Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von rT3 in menschlichem Serum und Plasma geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von rT3 in anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
2. Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Serum oder Plasma Proben.
3. Thimerosal oder Azide enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
4. Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNHINWEISE

POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

Alle Humanproben sollten in Übereinstimmung mit der guten Laborpraxis (GLP) als potentielle Biogefährdungen betrachtet werden, die in der Lage sein können Infektionen zu übertragen.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Serum:

Etwa 0,2 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4 - 5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht.

Plasma:

Etwa 0,2 ml Plasma ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4 - 5 ml Blut in EDTA-Plasma Röhrchen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Plasmaschicht.



Testen Sie die Proben nicht am selben Tag der Blutabnahme. Die Serum- oder Plasmaproben müssen vor dem Test unter den empfohlenen Lagerungsbedingungen mindestens 20 Stunden lang aufbewahrt werden.

Nach der Serum- oder Plasmasammlung müssen die Proben wie folgt gelagert werden:

- a) Gekühlt (2-8 °C) für einen Zeitraum von nicht mehr als 5 Tagen, oder
- b) Gefroren ($\leq -20^{\circ}\text{C}$) für einen Zeitraum von nicht mehr als 3 Monaten.


Mehrere Gefrier-/Auftauzyklen sind zu vermeiden.

Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen Sie geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.








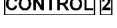
BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

1. Präzisionspipetten für 25, 50, 100, 150 und 350 µl
2. Einweg-Pipettenspitzen
3. Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
4. Mikrotiterplatten-Schüttler
Empfehlung: Orbital (3 mm Durchmesser) eingestellt auf 600 U/min.
Hinweis: Es können auch andere Schüttler verwendet werden, sofern die mit diesen Schüttlern erzielten Testergebnisse den Kriterien des im Kit beigefügten QC-Report und den Kriterien der Endbenutzerkontrollen entsprechen.
5. Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3,0 oder höher
6. Mikrotiter-Waschautomat (empfohlen)

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

- 1. AA E-0030** WASH-CONC 10x **Waschpufferkonzentrat** – erfordert eine Vorbereitung **X10**
- Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
- Volumen: 50 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.
- 2. AA E-0055** SUBSTRATE **TMB Substrat** – gebrauchsfertig.
- Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem Puffer.
- Volumen: 16 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- 3. AA E-0080** STOP-SOLN **Stopplösung** – gebrauchsfertig.
- Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
- Volumen: 6 ml/Flasche
- Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C
- Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.
- Mögliche Gefahren:  H315 Verursacht Hautreizungen.
H319 Verursacht schwere Augenreizung.

4. Standards und Kontrollen – gebrauchsfertig.

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration*	Volumen/Fläschchen
TF E-2501	 STANDARD A	Standard A	0 ng/ml	1,0 ml
TF E-2502	 STANDARD B	Standard B	0,02 ng/ml	1,0 ml
TF E-2503	 STANDARD C	Standard C	0,1 ng/ml	1,0 ml
TF E-2504	 STANDARD D	Standard D	0,4 ng/ml	1,0 ml
TF E-2505	 STANDARD E	Standard E	1 ng/ml	1,0 ml
TF E-2506	 STANDARD F	Standard F	2 ng/ml	1,0 ml
TF E-2551	 CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für akzeptablen Bereich!	1,0 ml
TF E-2552	 CONTROL 2	Kontrolle 2		1,0 ml

*Ungefährer Wert – die genauen Konzentrationen finden Sie auf den Etiketten der Fläschchen.

Inhalt: rT3 in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge von rT3, siehe Etikett/QC Zertifikat.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate in ungeöffneten Fläschchen oder gemäß Angabe auf dem Etikett angegeben.

5. TF E-2531 96 Mikrotiterplatte mit Anti-rT3-Polyklonaler Antikörper beschichtet - herausbrechbare Wells – gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

6. TF E-2510 rT3-Biotin Konjugate – gebrauchsfertig

Inhalt: rT3-Biotin-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 13 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

7. TF E-2540 Streptavidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) Konjugat – gebrauchsfertig

Inhalt: Streptavidin-HRP Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 20 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2 - 8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

TESTVERFAHREN

Probenvorbereitung: Siehe Abschnitt PROBENNAHME UND -LAGERUNG.

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	Nachdem alle Reagenzien Raumtemperatur erreicht haben, werden sie vorsichtig gemischt. Bereiten Sie die Waschlösung vor (siehe Waschpufferkonzentrat unter dem Abschnitt „MITGELIEFERTE REAGENZIEN“).
2.	Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
3.	Pipettieren Sie 25 µl jeder Standard, Kontrolle und Probe (Serum oder Plasma) jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells.
4.	Pipettieren Sie jeweils 100 µl des Reverse T3-Biotin Konjugate in jedes Well. (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
5.	Die Mikrotiterplatte auf einem Schüttler** für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubieren.
6.	Waschen Sie die Wells 3x mit 350 µl vorbereitetem Waschpuffer pro Well und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist. <i>Die Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen.</i> Die Genauigkeit des Assays hängt von der genauen Ausführung des Waschvorgangs ab.
7.	Pipettieren Sie jeweils 150 µl Streptavidin-HRP Konjugate in die Wells. (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
8.	Die Mikrotiterplatte auf einem Schüttler** für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
9.	Waschen Sie die Wells 3x wie im Schritt 6 beschrieben.
10.	Pipettieren Sie jeweils 150 µl TMB-substrat in definierten Zeitintervallen in die Wells. (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
11.	Die Mikrotiterplatte auf einem Schüttler** für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren oder bis Standard A die dunkelblaue Farbe für den gewünschten OD erreicht hat.
12.	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 10 je 50 µl Stopplösung in die Wells pipettieren. (Wir empfehlen die Verwendung einer Mehrkanalpipette). Vorsichtig die Platte für 10 Sekunden mit der Hand schütteln , um eine vollständige Durchmischung der Stopplösung in den Wells zu erreichen.
13.	Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
**siehe BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE (Punkt 4)	

BERECHNUNGEN

- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-, Kontroll- und Proben- Duplikats.
- In der Immunoassay-Software wählen Sie entweder ein 4-Parameter oder ein 5-Parameter Kurvenanpassungsverfahren zur Berechnung der Ergebnisse oder zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichte als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Die Konzentrationen der Kontrollen und Proben können direkt von der Kurve abgelesen werden.
- Wenn eine Probe mehr als 2 ng/ml anzeigt, verdünnen Sie sie mit Standard A in einer Verdünnung von nicht mehr als 1:5. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.
- Zur Umrechnung von ng/ml zu ng/dl wird das Ergebnis mit 100 multipliziert; zur Berechnung in nmol/l wird das ng/dl Ergebnis mit 0,01536 multipliziert oder zu ng/ml mit 1,536 multipliziert.

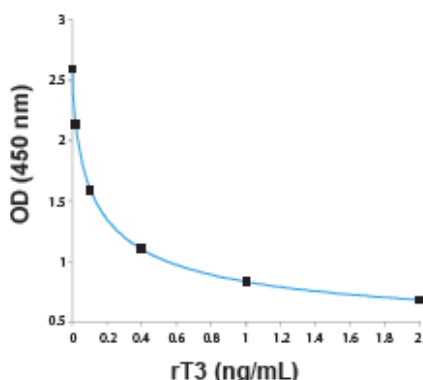
TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Beispieldaten. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.

Standard	rT3 (ng/ml)	Mittelwert OD (450 nm)
A	0	2,527
B	0,02	2,232
C	0,1	1,563
D	0,4	0,785
E	1	0,431
F	2	0,270
Unbekannt	0,15	1,289

TYPISCHE STANDARDKURVE

Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die Nachweisgrenze (LoD) wurde bestimmt, indem 60 Proben des Blanks und eine Probe mit niedrigen Konzentrationen in 2 unabhängigen Ansätzen analysiert wurden und die Berechnung war wie folgt:

$LOD = \mu_B + 1,645 \sigma_B + 1,645 \sigma_S$,
wobei σ_B und σ_S die Standardabweichungen des Blanks bzw. der niedrigen Probe bedeuten und μ_B den Durchschnittswert des Blanks darstellt.

Die Nachweisgrenze (LoD) beträgt demnach **0,014 ng/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von rT3 war:

Steroid	% Kreuzreaktion
rT3	100
T3	0
T4	< 0,1
T2	0

STÖRENDE SUBSTANZEN

Die folgenden Substanzen zeigen keine signifikanten Störungen im Assay: Hämoglobin bis zu 2 g/l, frei und konjugiertes Bilirubin bis zu 200 mg/ml, Triglyceride bis zu 5,0 mg/ml und Biotin bis zu 2,4 µg/ml.

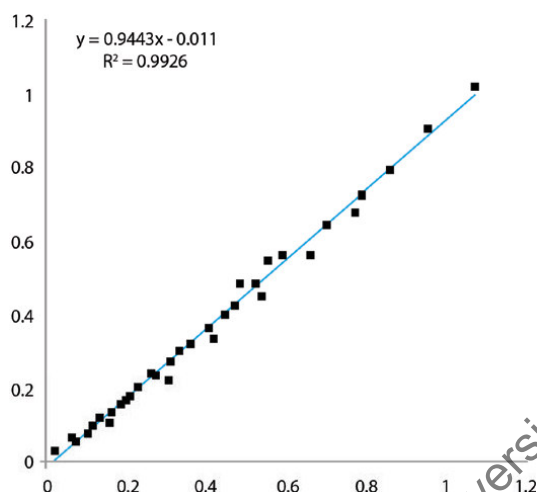
PRÄZISION

Das experimentelle Protokoll verwendete ein verschachteltes Komponenten-Varianz-Design mit 2 Testtagen, zwei Lots und fünf Wissenschaftlern pro Tag, jeder Wissenschaftler führte 2 Tests (einen Test mit jedem Lot) pro Tag und zwei Wiederholungsmessungen pro Durchgang (ein 2 x 5 x 2 x 2 x 2 Design) für jede Probe durch. Die Ergebnisse wurden mit einer bidirektionalen verschachtelten ANOVA analysiert und in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Probe	Mittelwert (ng/ml)	StAbw innerhalb eines Laufs	VK innerhalb eines Laufs (%)	StAbw total	VK total (%)
1	0,233	0,01	3,6	0,02	7,0
2	0,535	0,01	2,4	0,05	9,5
3	1,174	0,06	4,9	0,13	10,7
4	0,102	0,01	6,0	0,01	10,4
5	0,082	0,00	5,8	0,01	8,7
6	0,094	0,01	8,1	0,01	11,5
7	0,257	0,01	4,3	0,02	9,7
8	0,480	0,02	4,2	0,04	9,2

LINEARITÄT

Die Linearitätsstudie wurde mit vier humanen Serumproben durchgeführt, die den Bereich des Assays abdecken und der CLSI-Richtlinie EP6-A entsprechen. Die Proben wurden im Standard A bis zu einer Verdünnung von 1:5 verdünnt, in zweifacher Ausfertigung getestet und die Ergebnisse mit der vorhergesagten Konzentration verglichen. Die statistische Analyse zeigt, dass der Assay ausreichend linear ist.



VERGLEICHSTUDIEN

Das rT3 ELISA-Kit (y) wurde sowohl manuell als auch mit automatisierter Technologie getestet. Der Vergleich von 40 Proben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse:

$$y = 0,8452x + 0,0195, r = 0,96$$

REFERENZWERTE

Referenzwerte wurden durch Verwendung von kommerziellen humanen Proben und durch Berechnung anhand einer nicht-parametrischen Methode erstellt. Jedes Labor muss den Bereich der Referenzwerte für seine eigene Bevölkerung selbst erstellen.

Gruppe	N	Median (ng/ml)	95 % Bereich (ng/ml)	Bereich total (ng/ml)
Serum	120	0,15	0,098 - 0,218	0,069 - 0,262
Plasma	120	0,15	0,098 - 0,26	0,072 - 0,309














LITERATUR

1. van den Beld AW, et al. Thyroid Hormone Concentrations, Disease, Physical Function and Mortality in Elderly Men. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(1):6403 –9.
 2. Holtorf K. Thyroid Hormone Transport into Cellular Tissue.
 3. Journal of Restorative Medicine. 2014; 3(1):53–68.
 4. Holtorf K Peripheral Thyroid Hormone Conversion and Its Impact on TSH and Metabolite Activity. Journal of Restorative Medicine. 2014; 3(1):30 –52.
 5. Senese R et al. Thyroid: Biological Actions of "Non-classical" Thyroid Hormones. J Endocrinol. 2014; 221(2):R1–12.
 6. Warner MH, Beckett GJ. Mechanisms Behind the Non- thyroidal Illness Syndrome: An Update. J Endocrinol. 2010; 205(1):1–13.
 7. Peeters RP, et al. Tissue Thyroid Hormone Levels in Critical Illness. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 90(12):6498–507.
 8. Friberg L, et al. Association Between Increased Levels of Reverse Triiodothyronine and Mortality after Acute Myocardial Infarction. Am J Med. 2001; 111(9):699–703.
 9. Pimentel, CR et al. Reverse T3 as a Parameter of Myocardial Function Impairment in Heart Failure. Int J Cardiol. 2010; 145(1):52–3.
 10. Economidou F, et al. Thyroid Function During Critical Illness. Hormones (Athens). 2011; 10(2):117–24.
- Thyroid Hormone Transport. National Academy of Hypothyroidism.
<https://www.nahypothyroidism.org/thyroid-hormone-transport/#reverseT3>

ÄNDERUNGSHISTORIE

Vorherige Version:	6.0	Neue Version:	6.0a
Änderungen:	MITGELIEFERTE REAGENZIEN Gefahrenkennzeichnung der Komponente AA E-0080 aktualisiert		

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis		Chargennummer		In vitro Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten		Inhalt		CE-Kennzeichnung
	Achtung		Katalognummer		Vertriebspartner
	Herstellungsdatum				