

Anti-TPO kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung von Thyroid-Peroxidase-Autoantikörpern in humanem Blutserum

(Gebrauchsanweisung: Seite 4)

Enzyme immunoassay for quantitative determination of autoantibodies to thyroid peroxidase in human serum

(Instructions for use: page 29)

Manueller Test / Manual test

Abschnitt / Section 13

Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 14

IVD

Anti-TPO Kit
(Manueller Test)



96 Untersuchungen
96 tests

24-06

REF

Anti-TPO kit (manual test)

Anti-TPO Kit (Automatisierter
Test für "Alisei")












96 Untersuchungen
96 tests

24-06 A

REF

Anti-TPO kit (automated test
for "Alisei")

1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

IVD	In-vitro Diagnostika In vitro diagnostic medical device		EG-Konformitätserklärung EC Declaration of conformity
REF	Bestellnummer Catalogue number	LOT	Chargenbezeichnung Batch code
	Verwendbar bis Use by		Hersteller Manufacturer
H2O	Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water		Gebrauchsanweisung beachten Consult operating instructions
	Temperaturbegrenzung Temperature limitation		Biogefährdung Biological risks
MP	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)	SUB	Substrat Substrate
WASH P	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated	STOP	Stopplösung Stop solution
20X			
CAL	Kalibratoren Calibrators	OD	Optische Dichte Optical density
CONTROL	Kontrolle Control	DIL	Probenverdünnungspuffer Sample diluent
RCNS	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for < n > tests
ASSAYB	Analysenpuffer Assay buffer		Herstellungsdatum Date of manufacture
TRIAL	Trial-Lösung, 5000x konzentriert	CONJ	Konjugat Conjugate
5000X	Trial, 5000X concentrated		
			Irritant
			Warning

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Anti-TPO Testkit** wird für die **quantitative Bestimmung** von **Thyroid-Peroxidase-Autoantikörpern (Anti-TPO)** in **humanem Blutserum** verwendet.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

- REF 24-06** Für den manuellen Gebrauch;
- REF 24-06 A** Für den Gebrauch mit ELISA-Automat "Alisei", hergestellt durch die Firma Next Level S.r.l.

Die Gebrauchsanweisungen befinden sich:

- Abschnitt 13 Manueller Test;
- Abschnitt 14 Automatisierter Test "Alisei".

Anmerkung 1: *Die Konzentrationswerte der Kalibratoren können bei manuellem und automatisiertem Testkit variieren.*

Anmerkung 2: *Wir garantieren verlässliche Testergebnisse bei folgender Anwendung der Testkit:*

- REF 24-06 A** nur für ELISA-Automat "Alisei";
- REF 24-06** nur für den manuellen Gebrauch.

Bei Verwendung einer nicht vordefinierten Methode ist der Anwender dafür verantwortlich, sicherzustellen, dass diese für ELISA-Kits angemessen getestet wurde.

TPO ist ein Schlüsselenzym bei der Synthese der Thyroid-Hormone. Die Thyroid-Peroxidase-Autoantikörper gehören überwiegend zu den Immunglobulinen der Klasse G und seltener zu der Klasse M. Im Blutserum gesunder Personen kann die Anti-TPO-Konzentration bis 30 U/ml erreichen. Ein Überschreiten dieser Grenze weist auf eine autoimmune Störung hin, die durch die Reduktion der Thyroxin-Sekretion in der Regel zur Funktionsstörung der Schilddrüse führt.

Die Bestimmung der Anti-TPO-Konzentration im Blutserum wird zur Diagnose von Autoimmunerkrankung der Schilddrüse genutzt z.B. idiopathisches Myxödem, Hashimoto-Thyreoiditis, Basedow-Krankheit.

3. TESTPRINZIP

Mit Hilfe des **Anti-TPO Testkits** kann Anti-TPO der Immunglobulin-Klasse G bestimmt werden. Während der ersten Inkubation binden Anti-TPO-Antikörper der zu testenden Proben und Kalibratoren das TPO, das an die Innenfläche der Kavitäten gekoppelt ist. Während der zweiten Inkubation reagieren die immobilisierten Anti-TPO-Antikörper mit dem Konjugat (HRP-konjugiertes Anti-human IgG). Die Menge des gebundenen Konjugates ist direkt proportional zur Anti-TPO-Konzentration der zu testenden Probe.

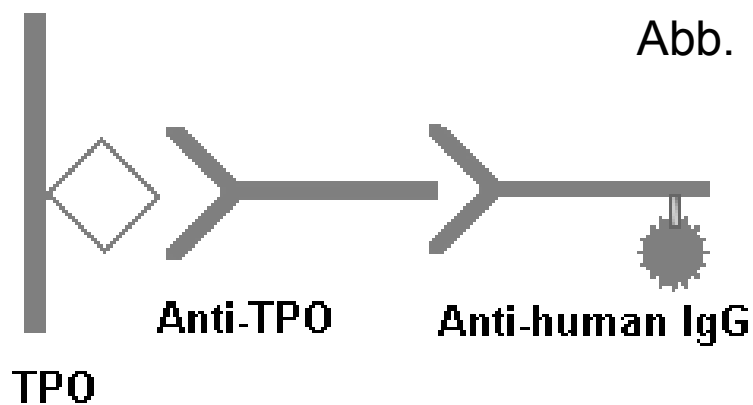


Abb. 1 Testschema

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbtintensität ist direkt proportional zur Anti-TPO-Konzentration der Probe. Die Anti-TPO-Konzentration in der Patientenprobe wird mit einer Standardkurve, die mit dem Testkit erarbeitet wird, ausgelesen.

4. LAGERUNG UND STABILITÄT DES TESTKITS

Das Verfallsdatum des kompletten Testkits ist auf dem Außenetikett angegeben; das Verfallsdatum jeder einzelnen Testkomponente ist auf dem jeweiligen Etikett angegeben.

Der **Anti-TPO Testkit** ist nach dem Empfang und bis zur Verwendung bis zum Verfallsdatum bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

Nach dem Öffnen ist der Testkit bei einer Lagerung von +2...+8 °C für 12 Monate haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern aber die Komponenten dürfen nie länger als bis zu ihrem Verfallsdatum verwendet werden:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel, konzentrierte Waschlösung und Stopplösung bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Probenverdünnungspuffer, Konjugat Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Substrat-Lösung: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;

- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschlösungskonzentrats, der Stopplösung und dem Analysepuffer: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Gebrauchsfertige Waschlösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage oder bei +2...+8°C für maximal 4 Wochen;
- Gebrauchsfertige Trial-Lösung: in einem dicht verschlossenen Behälter bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) für maximal 5 Tage.
- Klebeschutzfolie bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) oder bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum

Beschädigte Testkits

Im Falle einer schweren Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss Astra Biotech GmbH schriftlich innerhalb einer Woche nach dem Empfang der Ware informiert werden. Der Gebrauch stark beschädigter Komponenten für einen Testlauf wird nicht empfohlen.

5. PROBENGEWINNUNG UND -LAGERUNG

Blut durch Venenpunktion entnehmen. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation abgetrennt.

Es ist nicht zulässig, Blutplasma, hämolysiertes (hell rot) oder lipämischer (milchig) Serum sowie Natriumazid-haltige Serumproben zu benutzen.

Die Blutserumproben sind bei +2...+8 °C nicht länger als 5 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften

Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Anti-TPO Testkits** wurden 324 Blutserumproben, die zwischen 9 und 11 Uhr bei gesunden Blutspendern im Alter von 21 bis 45 Jahren entnommen wurden, untersucht. In 99,4 % der Fälle lag die ermittelte Anti-TPO-Konzentration unter 30 U/ml. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die Anti-TPO-Normkonzentrationen bestimmt.

7. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, Kontrollproben entsprechend der nationalen und regionalen Vorschriften zu benutzen. Der Einsatz der Kontrollproben sichert die Tag-zu-Tag Gültigkeit der Ergebnisse.

8. REAGENZIVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor dem Öffnen mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur lagern. Notwendige Anzahl der Streifen in den Rahmen einsetzen. Die unbenutzten Streifen in einen Druckverschlussbeutel legen und gut verschließen.

CAL CONTROL Kalibratoren und Kontrolle

Flüssige Kalibratoren und die flüssige Kontrolle sind gebrauchsfertig. Die lyophilisierten Kalibratoren und die Kontrolle wie folgt vorbereiten: Durch leichtes Klopfen auf den Deckel wird der Feststoff vom Flaschenrand gelöst.

Die Fläschchen werden vorsichtig geöffnet und die Deckelkappen umgedreht auf eine trockene und saubere Oberfläche gelegt.

0,5ml destilliertes oder deionisiertes Wasser wird jeweils in die Flaschen der Kalibratoren und der Kontrolle pipettiert, diese wieder mit dem jeweiligen Deckel verschlossen und 10 Minuten bei Raumtemperatur ohne Mischen inkubiert. Danach unter Vermeidung einer Schaumbildung sorgsam rühren bis der Feststoff komplett gelöst ist.

Weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur unter periodischem Schütteln inkubieren. Es darf kein Feststoff im Deckel oder an den Wänden der Fläschchen zurückbleiben.

WASH P Zubereitung der benötigten Menge der Waschlösung durch 20fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder deionisiertem Wasser:

5 ml **WASH P 20X** + 95 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

SUB Substrat vor direktem Licht schützen.

9. PROBENVORBEREITUNG

Vor dem Gebrauch müssen die zu testenden Proben auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Vor der Analyse sollten alle zu untersuchenden Proben (außer Kalibratoren und Kontrolle) sowohl beim manuellen Gebrauch als auch beim automatisierten Test entsprechend jeweiliger Gebrauchsanweisung mit Probenverdünnungspuffer **DIL** 100-fach verdünnt werden (Probe Nr. 1). Beispiel einer manuellen Verdünnung

Probe Nr. 1 (100fache Verdünnung):

990 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Serumprobe.

Ist die zu erwartende Anti-TPO-Konzentration der Probe 1 höher als im Kalibrator 5, sollte die Probe mit Probenverdünnungspuffer **DIL** 20-fach verdünnt werden (Probe Nr. 2).

Probe Nr. 2 (zusätzliche 20fache Verdünnung):

190 µl Probenverdünnungspuffer **DIL** + 10 µl Probe 1.

10. TESTCHARAKTERISTIKA

10.1 Kalibrierung:

Der **Anti-TPO Testkit** wurde gemäß dem international anerkannten NIBSC Forschungsstandard 66/387 kalibriert.

10.2 Spezifität:

Eine hohe Spezifität wird durch den Einsatz von hochreinem TPO erreicht.

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Anti-TPO Testkits**, d.h. minimale Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 4 U/ml. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (plus 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Der **Anti-TPO Testkit** ist validiert für die Detektion eines Anti-TPO-Konzentrationsbereiches (unverdünnt) von 4 – 500 U/ml für den manuellen Test und 4 - 1000 U/ml für den automatisierten Test.

10.5 Intra-assay und Inter-assay Varianz:

Um einen **Intra-Assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht. Die Testresultate sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere Anti-TPO-Konzentration, U/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	22,945	0,4	1,6
2	51,285	3,6	7,0

3	100,91	0,8	0,9
4	234,27	12,7	5,4
5	383,27	9,1	2,4
6	78,033	2,6	3,3
7	34,335	2,1	6,1
8	444,85	28,2	6,3

Alisei Testkit

Probe	Mittlere Anti-TPO-Konzentration, U/ml	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	67,345	2,5	6,4
2	44,794	1,5	7,6
3	13,108	13,1	7,9
4	278,902	15,2	5,9
5	95,711	7,3	1,7
6	383,27	11,3	3,9
7	843,81	27,2	6,9
8	354,007	16,8	5,8

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von einer Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Sample	Mittlere Anti-TPO-Konzentration, U/ml			Inter-Assay VK	
	1, Test	2, Test	3, Test	SD	VK, %
1	34,3	33,8	34,3	0,3	0,9
2	23,1	23,5	26,0	1,6	6,5
3	96,0	93,4	103,3	5,1	5,2
4	134,3	123,3	133,3	6,0	4,6
5	155,5	146,8	156,1	5,2	3,4
6	157,8	146,8	147,1	6,3	4,2
7	101,2	92,0	102,1	5,6	5,7
8	318,0	315,7	307,0	5,8	1,8

Alisei Testkit:

Probe	Mittlere Anti-TPO-Konzentration, U/ml			Inter-Assay VK	
	1, Test	2, Test	3, Test	SD	VK, %
1	14,9	15,2	14,8	1,9	5,3
2	34,6	34,5	37,8	0,6	1,1
3	55,2	56,1	55,0	2,6	3,5
4	77,8	75,3	72,6	1,1	1,2
5	90,1	89,3	91,4	4,5	3,4
6	137,7	128,9	131,7	22,3	6,6
7	344,6	312,4	355,1	31,5	4,2
8	722,1	754,7	785,0	0,2	1,4



11. GRENZEN DER METHODE



Eine klinische Diagnose sollte nicht allein mit Hilfe der Ergebnisse einer einzelnen diagnostischen Methode erhoben werden. Zur Diagnosestellung sollten vom Arzt alle verfügbaren klinischen und Laborbefunde berücksichtigt werden.

12. VORSICHTSMAßNAHMEN

- **Der Testkit ist ausschließlich zum in vitro–Gebrauch bestimmt.** Um zuverlässige Testergebnisse zu erhalten, ist die Arbeitsanleitung strikt einzuhalten. Diese Gebrauchsanweisung ist nur für den vorliegenden Testkit mit dem aufgeführten Inhalt gültig. Jeglicher Austausch der Kitkomponenten ist durch die CE-Regularien nicht gestattet.
- Der Testkit oder einzelne Kit-Komponenten dürfen nach Ablauf des auf der Verpackung angegebenen Verfallsdatums nicht mehr verwendet werden. Die vorn angegebene Haltbarkeit der verdünnten Komponenten muss ebenfalls berücksichtigt werden.

- Das Mischen oder die gleichzeitige Verwendung von Reagenzien verschiedener Testchargen, ausgenommen Substrat, Stopp- und Waschlösung, ist nicht gestattet.
- Substrat, Stopp- und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur "P"-gekennzeichnete Astra Biotech-Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 N Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
 - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
 - Kontamination der Lösungen vermeiden;
 - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
 - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
 - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;
 - Die Temperatur der Inkubation aller immunologischer Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
 - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;

- Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die Anti-TPO-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen.
- Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates.
-  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV (Human Immunodeficiency Virus) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis.
Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und Patienten Proben sollten deshalb immer wie potentiell infektiöses Material behandelt werden.
-  Nach dem Gebrauch werden Streifen, Kalibratoren, Kontrollen, Proben und alle Verbrauchsmittel (Reaktionsgefäße, Fläschchen, Handschuhe, Pipettenspitzen), die mit den Proben während der Bearbeitung oder Lagerung in Kontakt kamen, separat gesammelt und autoklaviert. Pipettenspitzen können anstelle des Autoklavierens durch Inkubation in desinfizierenden Substanzen sterilisiert werden.
Nach der Sterilisation können alle Komponenten und Einmal-Artikel als nicht gefährlicher Müll behandelt werden. Andere Kitbestandteile werden auf konventionelle Weise entsorgt.

-  Während der manuellen Waschprozedur Überstände nicht in den Abfluss geben, sondern in einen Behälter mit Desinfektionsmittel.
-  Beim Umgang mit potentiell infektiösem Material müssen die folgenden Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:
 - Im Laborraum nicht rauchen, nicht trinken und nicht essen;
 - Schutzhandschuhe verwenden;
 - Nie mit dem Mund pipettieren;
 - Verspritzen von Flüssigkeiten vermeiden. Sollte doch Flüssigkeit vergossen worden sein, diese sofort aufnehmen und die verschmutzte Oberfläche desinfizieren.
- Bei der Verwendung des Testkits müssen die Anforderungen der guten Laborpraxis (GLP) inklusive aller Richtlinien beachtet werden.



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **CAL**, **DIL**, **CONTROL**). Daher sollten folgende Vorsichtsmaßnahmen beachtet werden:

- P261 - Einatmen von Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden;
- P272 - Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen;
- P280 - Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen;
- P302+P352 - Bei Berührung mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen;
- P333+P313 - Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen;

- P363 - Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen;
- P501 - Inhalt/Behälter den nationalen Vorschriften entsprechend der Entsorgung zuführen.

Die Vorsichtsmaßnahmen entsprechen der Verordnung EG Nr. 1272/2008.

13. MANUELLER TEST (REF 24-06)

13.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit humanem TPO	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-Human IgG-Antikörpern konjugiert mit HRP	16 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Anti-TPO-Kalibratoren: Protein-Puffer mit definierter Anti-TPO-Konzentration: 0; 25; 50; 100; 250; 500 U/ml/(ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen Anti-TPO-Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Anti-TPO Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter Anti-TPO-Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische Anti-TPO-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid.	14 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2 x 14 ml, konzentriert
STOP	Stopplösung: 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig

ASSAYB	Analysenpuffer	14 ml, gebrauchsfertig
DIL	Probenverdünnungspuffer	50 ml, gebrauchsfertig
FOIL	Klebeschutzfolie	2x1 Folie

13.2 Erforderliche aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- geeichte, verstellbare Einkanal-Pipetten mit Einweg-Pipettenspitzen;
- geeichte, verstellbare 8-Kanal-Pipette mit Einweg-Pipettenspitzen;
- Mikrotiterplatten-Inkubator (+37 °C) oder Mikrotiterplatten-Inkubator/-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- separate Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

13.3 Testablauf

Der **Anti-TPO Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen ist der Testkit für die **quantitative Bestimmung** von 40 Unbekannten, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und des Blank (OD der TMB-Lösung) in Zweifachbestimmung ausreichend.

13.3.1. Assay-Durchführung

Anmerkung: Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.

Assay-Protokoll 1

(siehe auch Assay-Schema für Assay-Protokoll 1, Abschnitt 13.5)

Anmerkung: Dazugehörige Konzentrationen der Kalibratoren und Kontrollbereiche für das Assay-Protokoll 1 sind im Quality Control Sheet enthalten.

Alle Proben sollten in Doppelbestimmung getestet werden.

- A. 100 µl Analysenpuffer ASSAYB in alle Kavitäten außer Kavitäten A1-A2 («Blank») pipettieren.**
- B. 50 µl der Kalibratoren CAL (0-5), Kontrolle CONTROL und verdünnte Serumproben in Zweifachbestimmung in**

entsprechende Kavitäten pipettieren. **2 Kavitäten A1-A2 bleiben frei (Blank)!**

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie diese jetzt um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

C. 30 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

D. 5x, wie unter 13.3.2. beschrieben, waschen

E. 120 µl Konjugat [CONJ] in alle Kavitäten außer Kavitäten A1-A2 («Blank») pipettieren.

Anmerkung: Die Gesamtzeit der Pipettiertschritte darf 15 Minuten nicht überschreiten, da es somit zu einer erheblichen Variation der Inkubationszeit zwischen den Proben kommt und das Testergebnis somit unzuverlässig sein kann.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, nutzen sie nun eine neue Klebeschutzfolie um die Mikrotiterplatten zu verschließen.

F. 30 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.

Anmerkung: Wenn eine Klebeschutzfolie verwendet wird, entfernen sie diese nun vorsichtig von der Mikrotiterplatte.

G. 5x, wie unter 13.3.2. beschrieben, waschen.

H. 100 µl Substrat [SUB] in jede Kavität pipettieren; Streifen entweder bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) im

Dunkeln für **15–30 Minuten** (abhängig von der Farbintensität) oder für **10 Minuten bei +37 °C** unter Schütteln (**500-800 rpm**) inkubieren.

- I. **100 µl Stopplösung** **STOP** in alle Kavitäten (auch Blank) in selber Reihenfolge und Geschwindigkeit wie das Substrat pipettieren und für **1-2 Minuten bei Raumtemperatur schütteln**.
- J. Messen der **Optischen Dichte** bei **450 nm innerhalb von 20 Minuten**.

13.3.2 Waschen

Es wird empfohlen, ein automatisches Mikroplatten-Waschgerät mit 5 Waschzyklen und einem jeweiligen Waschvolumen von 300 µl pro Kavität und Zyklus zu benutzen. Die Waschprozedur kann ebenso manuell durchgeführt werden:

- Überstand aus den Kavitäten in einen Behälter mit Desinfektionsmittel werfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (siehe Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5 bis 10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand werfen. 5 Mal wiederholen;
- Ausklopfen der Kavitäten auf einer saugfähigen Unterlage bis alle Flüssigkeit entfernt ist.

13.4 Datenverarbeitung

Bei Benutzung eines Photometers, welcher keine Nullstellung erlaubt, wird der OD-Wert der Kavitäten A1-A2 (Blank) von allen anderen OD-Werten vor weiterer Kalkulation subtrahiert. *Beispiel:*

OD (Kalibrator 5) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;

OD (Kalibrator 5) berechnet = $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

- Mittelwert OD des Blank (Kavitäten A1-A2) $\leq 0,100$;
- Mittelwert OD des Kalibrators $5 \geq 1,0$ (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher im Quality Control Sheet angegebenen ist.

Sollten die gemessenen Daten die Bedingungen nicht erfüllen, werden die Resultate als unzulässig betrachtet und der Test sollte wiederholt werden.

13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige Anti-TPO-Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Anti-TPO-Konzentration der Probe wird mit der Standardkurve ermittelt.

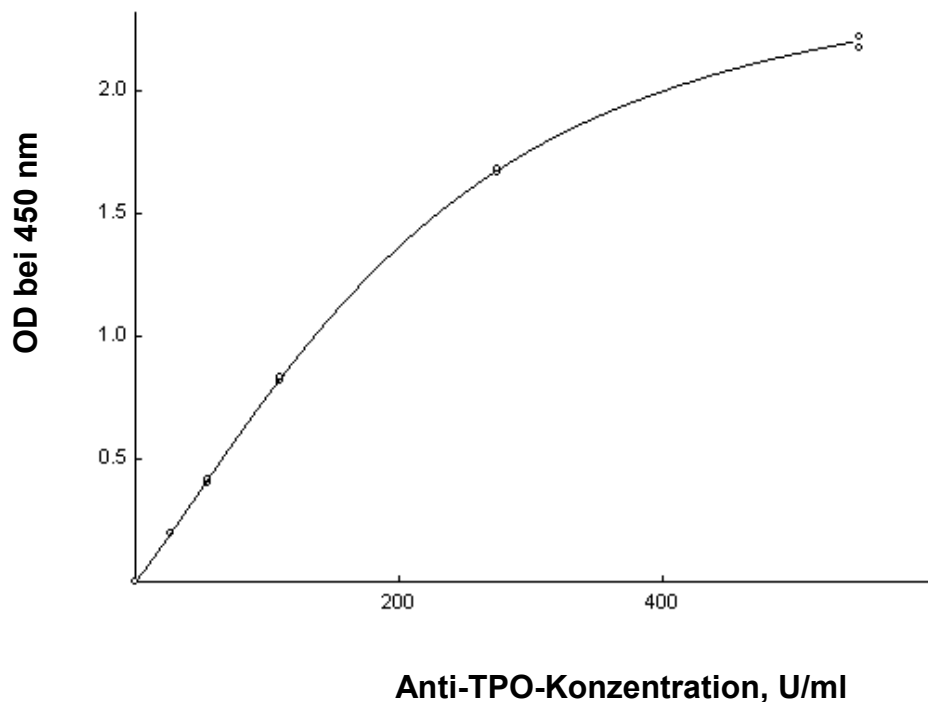


Abb. 2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

Eine Extrapolation der Standardkurve für Anti-TPO-Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten, ist nicht zulässig.

In diesem Fall sollte die Probe 20x mit Probenverdünnungspuffer verdünnt und erneut getestet werden. Die gemessene Konzentration der vorverdünnten Probe muss mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor (20x) multipliziert werden.

13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	CAL CONTROL	Proben
	ASSAYB	–	100 µl
CAL CONTROL	–	50 µl	–
Proben	–	–	50 µl
Inkubation No. 1	30 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
CONJ	–	120 µl	120 µl
Inkubation No. 2	30 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	5 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation No. 3	15–30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Stirring	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-06 A)

14.1 Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit humanem TPO	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus monoklonalen Anti-Human IgG-Antikörpern konjugiert mit HRP	17 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Anti-TPO Kalibratoren: Protein-Puffer mit definierter Anti-TPO-Konzentration: 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/ml (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische Anti-TPO-Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	8 Fläschchen, je 0,5 ml CAL 1,4-2×0,5ml; CAL 0,2,3,5- 1×0,5ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Anti-TPO Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter Anti-TPO-Konzentration. Der Anti-TPO-Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
STOP	Stopplösung: 1 M HCl - Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Ist separat zu bestellen
ASSAYB	Analysenpuffer	14 ml, gebrauchsfertig
DIL	Probenverdünnungspuffer	2x 50 ml, gebrauchsfertig

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 4 sowie **CONTROL** werden zur Rekalibrierung der Referenz-Standardkurve bereitgestellt. Genauere Informationen sind in der Gebrauchsanleitung des ELISA-Automaten "Alisei" zu finden.

14.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

- ELISA-Automat "Alisei";
- Polypropylen Röhren 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL** **5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

14.3 Testverfahren

Der **Anti-TPO Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine Einzelbestimmung von 88 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und für die Bestimmung des Blank (=OD der TMB-Lösung).

14.3.1 Reagenzienvorbereitung

Vor dem Gebrauch müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur (+18...+25 °C) gebracht und gründlich gemischt werden.

Anmerkung: Vorbereitung der anderen Reagenzien siehe Abschnitt 8.

TRIAL Trial-Lösung zum Reinigen der gerät-internen Hydraulikleitungen und Nadeln des ELISA-Automaten.

Zubereitung der benötigten Menge der Trial-Lösung vor der Analyse durch 5000fache Verdünnung des Konzentrates mit destilliertem oder entionisiertem Wasser:

2 ml **TRIAL** **5000X** + 9998 ml Wasser

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

14.3.2 Testablauf des automatisierten Tests

Bei Benutzung des ELISA-Automaten „Alisei“ ist die entsprechende Gebrauchsanweisung des Gerätes zu verwenden.

Die Durchführung des Enzymassays mit „Alisei“ ist komplett automatisch: Pipettieren der Reagenzien, Waschschrte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der Anti-TPO-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

14.4 Datenverarbeitung

14.4.1. Datenverarbeitung (für OD gemessen bei 450 nm)

Siehe Kriterien des Abschnittes **13.4.1**

14.5 Vorsichtsmaßnahmen

- Bei mehrfacher Nutzung des Testkit in einem ELISA-Automaten müssen die Reagenzien unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um den möglichen Verlust durch Verdunstung zu vermeiden. Die Reagenzien sind in den Kühlschrank zu stellen.
- Die Rekalibrierung anhand der Standardkurve eines Testkits mit anderer Lotnummer ist nicht zulässig.

2. INTENDED USE

The **Anti-TPO kit** is provided for the **quantitative** determination of **autoantibodies to thyroid peroxidase (Anti-TPO)** in human serum.

This test has 2 complete sets:

REF 24-06 for manual use;

REF 24-06 A must be used with ELISA automatic instrument “Alisei” manufactured by NEXT Level S.r.l. hereinafter referred to as analyser “Alisei”.

Instructions for use are described in:

section 13 for manual test,

section 14 for analyser

Note 1: *Take into account that calibrators' nominals can be different for manual and automatic test kits.*

Note 2: *We guarantee applications of the test*

REF 24-06 A *only on analyser “Alisei”,*

REF 24-06 *only for manual use.*

While using a non-predefined method of use it is under end user responsibility to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.

TPO is a key enzyme in the biosynthesis of thyroid hormones. Anti-TPO are mainly IgG and, less frequently, IgM. In healthy individuals, concentrations of Anti-TPO in serum can reach 30 U/mL. A level exceeding this limit is the sign of an autoimmune process that usually leads to thyroid dysfunction, mainly due to reduced thyroxin secretion.

Quantitative determination of Anti-TPO in serum is used for diagnostics of autoimmune thyroid diseases, such as idiopathic mixoedema, Hashimoto thyroiditis and Graves' disease.

3. PRINCIPLE OF TEST

The **Anti-TPO kit** detects Anti-TPO of IgG class. During the first incubation, Anti-TPO from test samples and calibrators binds to TPO coated onto the inner surface of the microplate wells. During the second incubation immobilized Anti-TPO reacts with conjugate (HRP-labeled anti-human IgG). Quantity of the bound conjugate is directly proportional to Anti-TPO concentration in tested sample (Fig. 1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is directly proportional to Anti-TPO concentration in specimens. Anti-TPO concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

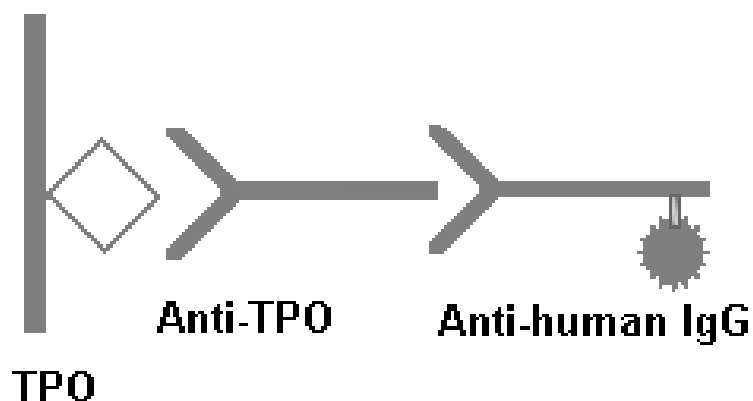


Fig. 1 Assay scheme

4. STORAGE AND STABILITY OF THE KIT

The expiration date of the kit is printed on the box label; the expiration date for each component is printed on the respective label. The **Anti-TPO kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed, but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

After initial opening the kit is stable for 12 months, if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows but never used longer than the expiration date:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vial with substrate: at +2...+8 °C until expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, sample diluent, concentrated wash solution, stop solution and assay buffer: at +2...+8 °C until the expiration date;
- wash solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days or at +2...+8°C for maximal 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days in a firmly closed bottle.

Damaged Test Kits

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture. After clotting, the serum is separated by centrifugation.

Do not use plasma, haemolyzed (bright red) or lipaemic (milky) serum samples as well as samples containing sodium azide as preservative.

Store serum samples at +2...+8 °C for no more than 5 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

324 serum samples collected between 9–11 a.m. from healthy individuals at the age 21-45 were assayed with **Anti-TPO kit**. In 99.4% of patients Anti-TPO concentration did not exceed 30 U/mL. This limit should be considered as guidelines only.

It is highly recommended for each laboratory to determine its own reference range of Anti-TPO concentrations.

7. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to the state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

8. REAGENT PREPARATION

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

MP Keep the **microplate** at room temperature for at least 30 minutes before opening the bag. Place required number of strips onto strip holder. Place unused strips into the resealable zipper bag and reseal duly.

CAL CONTROL Calibrators and Control

Liquid calibrators and control are ready to use.

Prepare lyophilized calibrators and control as follows. Gently tap on the vial caps to knock off all the dry matter. Open the vials and carefully place the caps upside down on the clean dry surface. Add 0.5 mL of distilled or deionized water to each vial with lyophilized calibrators and control, close vials with the corresponding caps and leave for 10 min at room temperature without stirring. Then stir gently avoiding foaming, until the dry matter is completely dissolved. Leave for another 10 minutes at room temperature stirring gently periodically. Make sure that no dry matter is left on the caps and walls of the vials.

WASH P Prepare required volume of **wash solution** by dilution of the concentrate 20-fold with distilled or deionized water. For example:

5 mL **WASH P 20X** + 95 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

SUB Protect **substrate** from direct light.

9. SAMPLE PREPARATION

Allow samples to reach room temperature (+18...+25 °C). Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

Before the analysis all the serum samples (except calibrators and control) should be diluted 100-fold with sample diluent **DIL** in concordance with instructions for use for manual test or automatic test. Example of manual sample dilution as follows (Sample 1):

Sample 1 (100-fold dilution):

990 µL sample diluent **DIL** + 10 µL serum sample

If expected Anti-TPO concentration in the sample 1 is higher than in calibrator 5, it should be diluted 20-fold with sample diluent **DIL** (Sample 2).

Sample 2 (additional 20-fold dilution):

190 µL sample diluent **DIL** + 10 µL sample 1

10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

10.1. Calibration-Traceability:

Anti-TPO test kit was calibrated against internationally approved NIBSC Research Standard 66/387.

10.2. Specificity:

High specificity of the assay is ensured by high purity TPO that was used for manufacture of the kit.

10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Anti-TPO assay**, i.e. concentration that can be distinguished from calibrator 0, is 4 U/mL. It is defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 plus two SD standard deviations.

10.4. Measurement Range:

The **Anti-TPO kit** was validated for measurement of Anti-TPO concentration within the concentration diapason (without dilution) of 4-500 U/mL (for manual test) and 4-1000 U/mL (for analyser “Alisei”).

10.5. Intra- and Inter-Assay Variation:

To determine **Intra-Assay CV**, 8 serum samples were assayed in 9 replicates each. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean concentration of Anti-TPO, U/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	22.945	0.4	1.6
2	51.285	3.6	7.0
3	100.91	0.8	0.9
4	234.27	12.7	5.4
5	383.27	9.1	2.4
6	78.033	2.6	3.3
7	34.335	2.1	6.1
8	444.85	28.2	6.3

Alisei kit

Sample	Mean concentration of Anti-TPO, U/mL	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	67.345	2.5	6.4
2	44.794	1.5	7.6
3	13.108	13.1	7.9
4	278.902	15.2	5.9
5	95.711	7.3	1.7
6	383.27	11.3	3.9
7	843.81	27.2	6.9
8	354.007	16.8	5.8

To determine **Inter-Assay CV** 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was assayed in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean concentration of Anti-TPO, U/mL			Inter-Assay CV	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	34.3	33.8	34.3	0.3	0.9
2	23.1	23.5	26.0	1.6	6.5
3	96.0	93.4	103.3	5.1	5.2
4	134.3	123.3	133.3	6.0	4.6
5	155.5	146.8	156.1	5.2	3.4
6	157.8	146.8	147.1	6.3	4.2
7	101.2	92.0	102.1	5.6	5.7
8	318.0	315.7	307.0	5.8	1.8

Alisei kit

Sample	Mean concentration of Anti-TPO, U/mL			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	14.9	15.2	14.8	1.9	5.3
2	34.6	34.5	37.8	0.6	1.1


3	55.2	56.1	55.0	2.6	3.5
4	77.8	75.3	72.6	1.1	1.2
5	90.1	89.3	91.4	4.5	3.4
6	137.7	128.9	131.7	22.3	6.6
7	344.6	312.4	355.1	31.5	4.2
8	722.1	754.7	785.0	0.2	1.4


11. LIMITATION OF THE METHOD

Any clinical diagnosis should not be based on the results of in vitro diagnostic methods alone. For diagnosis establishment, a physician is supposed to consider all available clinical and laboratory findings.



12. SAFETY PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.

- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
 - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
 - avoid contamination of the solutions;
 - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
 - do not pour unused reagents back into the original vials;
 - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
 - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
 - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
 - do not touch the bottom of the wells;
 - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time anti-TPO concentration in the control.
 - Carefully remove the protective adhesive film to avoid contamination and do not use the same protective adhesive film again.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  Source materials of human origin used for kit components preparation were tested and found negative for HBsAg, anti-HIV and anti-HCV antibodies. However, none of known laboratory test guarantees absence of these viral agents. Therefore, all kit components and patient's samples should be handled as potentially hazardous.

-  After usage strips, calibrators, control, specimens and all consumables which contacted with specimens during handling, storage or assay (tubes, vials, gloves, pipette tips etc.) should be collected separately and sterilized by autoclaving. Instead of autoclaving pipette tips may be sterilized by disinfectant treatment.

After sterilization all components and expendable materials may be utilized as non-dangerous garbage. Other components of the kit should be discarded into conventional garbage.

-  During manual washing procedure do not discard the contents of the wells directly to drainage. Use a container with disinfectant solution.
-  As the kit contains potentially hazardous material, the following precautions should be taken:
 - do not smoke, eat or drink while performing the assay;
 - always use protective gloves;
 - never pipette material by mouth;
 - in case of spilling, wipe up the spills promptly and wash affected area thoroughly using decontaminant.
- GLP including all general and individual regulations should be applied for the kit usage.



As the kit contains irritant (**CONJ**, **CAL**, **DIL**, **CONTROL**), the following precautions should be observed:

- P261 - Avoid breathing spray;
- P272 - Contaminated work clothing should not be allowed out of the workplace;
- P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection;

- P302+P352 - IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water;
- P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention;
- P363 - Wash contaminated clothing before reuse;
- P501 - Dispose of contents/container in accordance with national regulation.

Precautionary statements according to Regulation EC № 1272/2008.

13. MAUAL TEST (REF 24-06)

13.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with human TPO	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing monoclonal antibodies against human IgG conjugated with HRP	16 mL, ready to use
0-5 CAL	Anti-TPO calibrators: protein-based solution containing known Anti-TPO concentrations – 0; 25; 50; 100; 250; 500 U/mL (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific Anti-TPO-concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	Anti-TPO control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known Anti-TPO concentration. The range of Anti-TPO-concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of Anti-TPO-concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	0.5 mL, ready to use or lyophilized
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2 x 14 mL, concentrated

STOP	Stop reagent: 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
ASSAYB	Assay buffer	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent	50 mL, ready to use
	Adhesive foil	2x1 foil (optional)

13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, 500–800 rpm);
- manual or automatic equipment for rinsing wells;
- calibrated microplate reader (450 nm);
- vortex tube mixer;
- deionized or distilled water;
- graduated beaker and cylinder of appropriate volume;
- latex or plastic gloves;
- trays for pipetting reagents with 8-channel pipette;
- disinfectant;
- absorbent material (for manual wash).

13.3. Test Procedure

The **Anti-TPO kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the **quantitative assay** of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

13.3.1. Assay Procedure

Note: *Please check in the Quality Control Sheet supplied with the kit for which Assay Protocol your kit has been validated. If your kit has been validated for Assay Protocol 1, please follow the Assay Protocol 1 described below. If your kit has been additionally validated for Assay Protocol 2, please consider the Supplement 1 to the Instructions for use provided with the kit.*

Assay Protocol 1

(see also Assay scheme to Assay Protocol 1, section 13.5)

Note: *Consider concentrations of calibrators and control range for Assay Protocol 1 provided in the Quality Control Sheet.*

All samples should be tested in duplicates.

A. Pipette **100 μ L assay buffer** **ASSAYB** into each well, **Leave wells A1-A2 empty for blank!**

B. Pipette **50 μ L of calibrators** **CAL** (0-5), **control** **CONTROL** and diluted **patient's samples in duplicates** into the respective wells.

Note: *total time of dispensing must not exceed 15 minutes, otherwise the test result may be unreliable, because the time of incubation will substantially vary for different samples.*

Note: *If an adhesive foil is used, put it now onto the plate to seal the cavities.*

C. Incubate strips for **30 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**

Note: *If an adhesive foil is used, remove it now from the plate.*

D. Wash 5 times, as described below.

E. Pipette **120 µL conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**

F. Incubate strips for **30 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**

G. Wash 5 times, as described below.

H. Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**

I. Pipette **100 µL stop solution** **STOP** into each well (including blank) in the same sequence and at the same speed as used for dispensing TMB substrate. **Shake for 1–2 min at room temperature.**

J. Read OD at **450 nm within 20 min.**

13.3.2. Wash Procedure

It is advisable to use an automatic microplate washer set at 5 wash cycles and a volume of 300 µL of wash solution per well per cycle. If an automatic washer is not available, the wash procedure can be carried out manually as follows:

- remove the contents of the wells into a container with disinfectant;
- dispense 300 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 5 times;

- strike the wells sharply on absorbent material to remove any liquid residue.

13.4. Data Processing

If the reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in wells A1-A2, subtract mean OD value of wells A1-A2 from all OD values before further calculations.

Example:

OD (Cal 5) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 5) calculated = $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

13.4.1. Data Reliability (OD 450 nm)

The data should meet the following criteria:

- average blank OD (in wells A1-A2) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 5 ≥ 1.0 (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in the Quality Control Sheet.

If the data obtained do not meet the criteria, the results are considered unreliable and the test should be repeated.

13.4.2. Quantitative Determination

Specialized software for quantitative determination is recommended. Mean OD of calibrators are plotted versus their respective Anti-TPO concentrations using **4PL** or **5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of Anti-TPO in samples using standard curve.

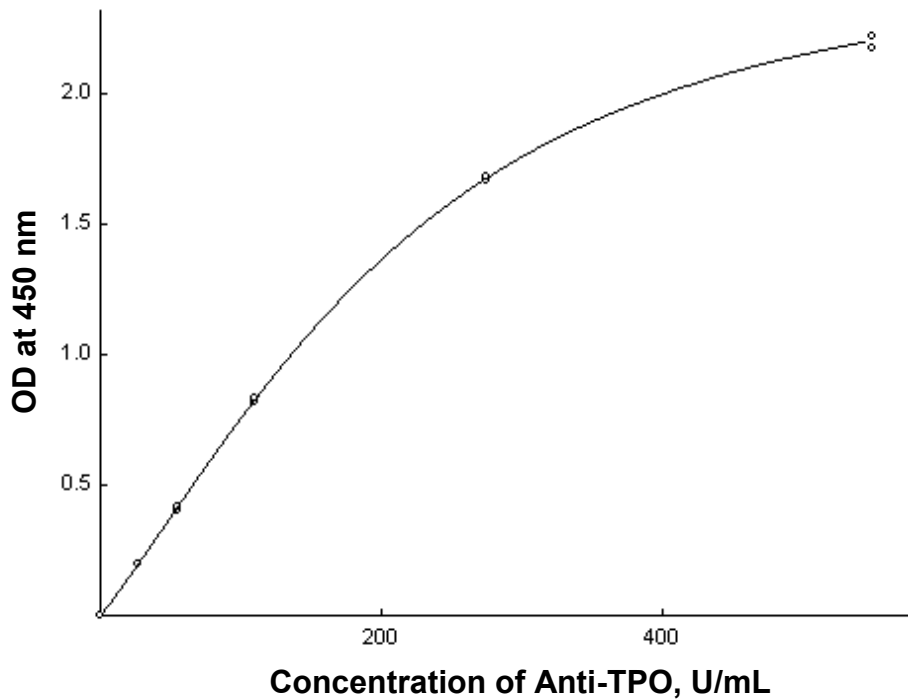


Fig. 2 Example of typical standard curve.

Do not use for evaluation of real assay data!

Any extrapolation of the standard curve to Anti-TPO concentration above the nominal value of **calibrator 5** is forbidden. In this case, the sample should be additionally diluted 20-fold with sample diluent and re-tested. Multiply the measured concentration of additionally pre-diluted samples by additional dilution factor (20-fold).

13.5. Assay scheme to Assay Protocol 1

Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
Reagents			
ASSAYB	–	100 µL	100 µL
CAL CONTROL	–	50 µL	–
Samples	–	–	50 µL
Incubation No. 1	30 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
CONJ	–	120 µL	120 µL
Incubation No. 2	30 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	5 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No. 3	15–30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

14. AUTOMATIC TEST (REF 24-06 A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with human TPO	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing monoclonal antibodies against human IgG conjugated with HRP	17 mL, ready to use
0-5 CAL	Anti-TPO calibrators: protein-based solution containing known Anti-TPO concentrations – 0; 25; 100; 250; 500; 1000 U/mL approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific Anti-TPO concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	8 vials, 0.5 mL each: CAL 1,4- 2×0.5 mL; CAL 0, 2, 3, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTRO L	Anti-TPO control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known Anti-TPO concentration. For lot specific ranges of Anti-TPO- concentration see Quality Control Sheet	2 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
SUB	Substrate (TMB solution): 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
STOP	Stop reagent: 1 N HCl solution	19 mL, ready to use
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order.
ASSAYB	Assay buffer	14 mL, ready to use
DIL	Sample diluent	2x 50 mL, ready to use

Note: Extra vials of **CAL** 1, 4 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyser “Alisei”.

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyser for ELISA kits on microplate (analyser “Alisei”);
- multipurpose polypropylene tubes 12x75 volume 5.5 mL;
- **TRIAL** **5000X** Trial solution, 5000X concentrated;
- deionized or distilled water;
- latex or plastic gloves.

14.3. Test Procedure

The **Anti-TPO kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

14.3.1. Reagent Preparation

Allow all the reagents to reach room temperature (+18...+25 °C), and then thoroughly stir.

Note: Preparation of other reagents see in section 8.

TRIAL Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”.

Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

2 mL **TRIAL** **5000X** + 9998 mL water

Mix thoroughly, avoid foaming.

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

While using for the analyser “Alisei”, refer to its relative manual.

The analysis on analyser “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation anti-TPO concentration is hardwired in analyser memory.

14.4. Data Processing

14.4.1. Data Reliability (OD 450 nm)

See criteria in section **13.4.1.**

14.5. Safety precautions

- If kit for analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from analyser “Alisei” immediately after pipetting them in the wells of all plates because liquid evaporates from vials. Put the reagents in refrigerator;
- Recalibration using calibration curve, obtained with kit of any other lot, is not permitted.

August 26, 2019



Astra Biotech GmbH
Rudower Chaussee 29,
12489 Berlin, Germany
Telefon: +49 (0) 30 74696509
E-Mail: info@astrabiotech.de
www.astrabiotech.de