

# Free T3 kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung  
von freiem Triiodthyronin in humanem Blutserum  
(*Gebrauchsanweisung: Seite 3*)

Enzyme immunoassay for quantitative determination  
of free triiodothyronine in human serum  
(*Instructions for use: page 26*)

Manueller Test / Manual test  
Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 13*  
*Abschnitt / Section 14*

**IVD**

Free T3 Kit (Manueller Test)  
Free T3 kit (manual test)



96 Untersuchungen  
96 tests

**24-09**

**REF**

Free T3 Kit (Automatisierter  
Test für "Alisei")  
Free T3 kit (automated test  
for "Alisei")


























96 Untersuchungen  
96 tests

**24-09 A**

**REF**

## 1.KENNZEICHEN / SYMBOLS LEGEND

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

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Free T3 Kit** ist für die **quantitative Bestimmung** von **freiem Triiodthyronin (fT<sub>3</sub>)** in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 24-09** Für den manuellen Gebrauch

**REF 24-09 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 Testkits:*

**REF 24-09 A** nur für ELISA-Automat "Alisei"

**REF 24-09** 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.*

Das Triiodthyronin (T<sub>3</sub>) ist ein Schilddrüsenhormon mit einer Molekularmasse von 651 Da. L-Triiodthyronin zirkuliert im Blut überwiegend (>99,5%) in einer Form, in der es an Trägerproteine gebunden ist. Jedoch gilt nur das freie Triiodthyronin als biologisch aktiv.

Daher gibt die Konzentration des freien  $T_3$  typischer Weise den Status der Schilddrüsenfunktion besser wieder

als die Konzentration des gesamten  $T_3$ , weil sie von klinischen Parametern wie Schwangerschaft, der Einnahme oraler Kontrazeptiva oder einer Steroid-Behandlung unabhängig ist. Die quantitative Bestimmung der freien  $T_3$ -Konzentration im Blut hat diagnostische Bedeutung bei der Beurteilung des Schilddrüsenzustandes.

Die Konzentrationsmessung vom freien  $T_3$  ist medizinisch besonders relevant in Fällen von  $T_3$ -Thyreotoxikosen, Euthyroid-Sick-Syndrome (ESS), Schilddrüsenhormon-Resistenz, bei der Klassifikation des Schweregrades der Thyreotoxikosen sowie bei der Überwachung von Antithyroid-Therapien.

Die Absenkung der  $fT_3$ -Konzentration kann auf primäre, sekundäre oder tertiäre Hypothyreose hinweisen. In manchen Fällen findet eine Absenkung des  $fT_3$ -Spiegels auch bei Nicht-Schilddrüsenenerkrankungen statt – unkompensierte primäre Nebennierensuffizienz, schwere somatische und mentale Pathologien, während der Regeneration nach einer schwerer Erkrankung sowie bei kalorienarmen oder eiweißarmen Diäten.

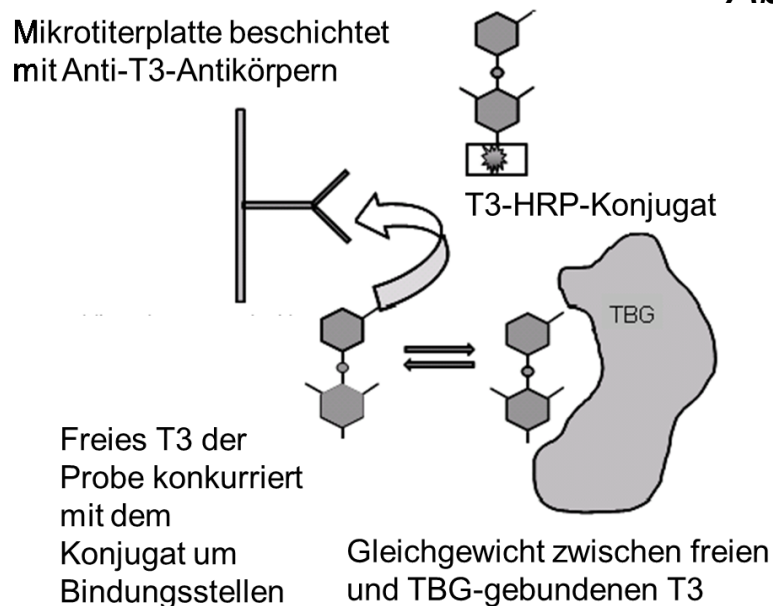
Ein erhöhter  $fT_3$ -Wert ist bei folgenden Störungen zu beobachten: Schilddrüsenentzündungen, Schilddrüsenhormon-Resistenz, bei TSH-unabhängiger Thyreotoxikose, Thyreotropinom, thyreotoxischen Adenom, Morbus Basedow, und  $T_3$ -Toxikose. Ferner ist eine Zunahme der  $fT_3$ -Konzentration bei postnatalen Funktionsstörungen der Schilddrüsen, nephrotischem Syndrom, chronischen Lebererkrankungen oder nach einer Hämodialyse möglich.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Free T3 Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay. Während der Inkubation binden sowohl das freie  $T_3$  der zu testenden Probe als auch das Meerrettich Peroxidase (HRP)-gebundenes  $T_3$  an die Antikörper, die an den festen Phasen der Mikrotiterplatten gekoppelt sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt.

Beim Leeren der Kavitäten wird das freie  $T_3$  von dem an die Antikörper gebundenen  $T_3$  und  $T_3$ -HRP-Konjugat getrennt. Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des  $fT_3$  in der Probe (Abb.1).

*Abb. 1 Testschema*



Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist indirekt proportional zur Konzentration des freien  $T_3$  der Probe. Die  $T_3$ -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 **Free T3 Testkit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Verfallsdatum zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 12 Monate. Nach der Öffnung ist der Testkit bei einer Lagerung bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum haltbar.

Wenn der Testkit in mehreren getrennten Experimenten verwendet wird, ist der Inhalt nach dem Öffnen wie folgt zu lagern:

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Probenpuffer, Konjugate, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig) bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei einer Temperatur von +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung: bei einer Temperatur von +2..+8 °C bis zum Verfallsdatum, **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial-Lösung, des Waschpuffer-Konzentrates und der Stopplösung: bei einer Temperatur von +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.

### **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 und in ein Antikoagulantien-freies Röhrchen geben. Nach der Gerinnung wird das Serum durch Zentrifugation von den Blutzellen abgetrennt.

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

Die Proben sind bei der Temperatur von +2...+8 °C nicht länger als 2 Tage zu lagern. Bei Notwendigkeit einer dauerhaften Aufbewahrung wird empfohlen, die Probe zu aliquotieren und bei Temperatur von  $\leq -20$  °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

## 6. REFERENZWERTE

Der mit dem **Free T3 Testkit** ermittelte  $fT_3$ -Konzentrationsbereich von 200 Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr morgens bei gesunden 18- bis 45-Jährigen beider Geschlechter entnommen wurden, lag zwischen 2,5–7,5 pmol/l.

Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe. Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die  $fT_3$ -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 der Öffnung 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. 0,5 ml 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

Proben auf Raumtemperatur bringen und sorgfältig mischen, um Homogenität zu erreichen.

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1. Kalibrierung:

Der **Free T3 Testkit** wurde mit Hilfe eines auf dem Markt erhältlichen Testkits kalibriert, der mit Hilfe einer Gleichgewichtsdialyse kalibriert wurde.

### 10.2. Spezifität:

Die Kreuzreaktion der monoklonalen Anti-T<sub>3</sub>-Antikörper mit anderen Schilddrüsenhormonen ist in folgender Tabelle dargestellt:

Thyroid	Kreuzreaktion, %
Triiodthyronin	100
L-Thyroxin	< 0,1
D-Thyroxin	< 0,1
r-Triiodthyronin	< 0,1
Diiodthyrosin	< 0,1

### 10.3. Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Free T3 Testkits**, d.h. die Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 0,5 pmol/l. Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 8fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

### 10.4. Messbereich:

Der **Free T3 Testkit** (manuelles und Alisei kit) ist validiert für die Detektion eines Konzentrationsbereiches von 0,5 bis 60 pmol/l.

### 10.5. Messeinheiten:

Im **Free T3 Testkit** sind die Konzentrationswerte der Kalibratoren in pmol/l dargestellt. Für eine Umrechnung der fT<sub>3</sub>-Konzentrationen in pg/ml muss der Konzentrationswert in pmol/l mit 0,651 multipliziert werden.

### 10.6. Intra-assay und Inter-assay Varianz (Präzision):

Um einen **intra-assay Variationskoeffizienten** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben, jeweils in 9fach-Bestimmung untersucht.

Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

Manuelles Testkit

Probe	Mittlere fT <sub>3</sub> -Konzentration, pmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	1,5	0,49	22,5
2	3,8	0,35	9,8
3	5,4	0,24	4,5
4	5,8	0,31	5,4
5	6,2	0,37	6,0
6	7,2	0,94	13,1
7	20,2	2,86	14,2
8	39,3	4,95	12,6

Alisei Testkit

Probe	Mittlere fT <sub>3</sub> -Konzentration, pmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	0.8	0,08	10,1
2	2.1	0,18	8,7
3	3.3	0,30	9,1
4	4.9	0,17	3,5
5	6.4	0,20	3,1
6	10.5	0,27	2,6
7	24.0	2,74	11,4
8	38.0	5,12	13,5

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

Probe	Mittlere fT3-Konzentration, pmol/l			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	1,75	1,84	1,66	0,232	14,0
2	1,82	1,77	1,32	0,275	16,8
3	3,70	3,54	4,25	0,372	9,7
4	5,62	5,50	5,26	0,183	3,4
5	6,14	6,27	5,93	0,233	3,8
6	8,06	7,8	8,2	1,201	14,9
7	20,81	18,6	17,2	1,321	7,0
8	39,0	36,2	41,4	4,897	12,6

### Alisei Testkit

Probe	Mittlere fT3-Konzentration, pmol/l			Inter-assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	0.8	1.0	0.9	0,10	11,1
2	2.1	1.9	2.4	0,25	11,8
3	3.3	3.5	3.8	0,25	7,1
4	4.9	4.9	5.6	0,40	7,9
5	6.4	7.1	6.6	0,36	5,4
6	10.5	10.0	11.3	0,66	6,2
7	24.0	20.6	27.1	3,25	13,6
8	38.0	42.9	44.6	3,42	8,2

## 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 Packungsinhalt 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 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, Stopplösung und Waschlösung anderer Hersteller nicht verwenden.
- Nur “P”-gekennzeichnete Astra Biotech Waschlösung benutzen.
- Die Stopplösung ist eine 1 M 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 immunologischen Reaktionen muss bei +37 °C liegen;
  - Den Boden der Kavitäten nicht berühren;
  - Kalibratoren müssen bei jedem Testlauf gemessen werden. Es wird außerdem empfohlen, die  $fT_3$ -Konzentration der Kontrolle jedes Mal zu bestimmen.
  
- 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 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**, **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 24-09)

### 13.1. Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti- T <sub>3</sub> - Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus T <sub>3</sub> konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>ASSAYB</b>	<b>Analysenpuffer:</b> Protein-Puffer	12 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter fT <sub>3</sub> -Konzentration: 0; 1,5; 3; 10; 20; 60 pmol/l. Die genauen fT <sub>3</sub> -Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter fT <sub>3</sub> - Konzentration. Der genaue fT <sub>3</sub> - Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 560 ml Lösung.	2 x 14 ml, konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 M HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig

## 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/-Schüttler (+37 °C, 500-800 rpm);
- Equipment zum manuellen oder automatischen Waschen;
- Spektralphotometer für Mikrotiterplatten (450 nm);
- Vortexer;
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser;
- Messzylinder, Becherglas;
- Labor-Handschuhe;
- Behälter zum Pipettieren mit 8-Kanal-Pipette;
- Desinfektionsmittel;
- Absorbierendes Material (zum manuellen Waschen).

## 13.3. Testablauf

Der **Free T3 Testkit** ist für 96 Untersuchungen bestimmt. Vorbehaltlich einer gleichzeitigen Anwendung aller Streifen reicht ein Testkit für eine quantitative Doppelbestimmung von 40 Serumproben, 6 Kalibratoren, 1 Kontrolle und 1x Blank (=OD der TMB-Lösung).

### 13.3.1. Testdurchführung

(Testschema, Abschnitt 13.5)

- A. **80 µl Analysenpuffer** **ASSAYB** in alle Kavitäten **außer Kavitäten A1-A2**, pipettieren.
- B. **20 µl** der **Kalibratoren** **CAL** (0-5), **Kontrolle** **CONTROL** und **Patientenproben** in **Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. **2 Kavitäten A1-A2 bleiben frei («Blank»)**!
- C. **45 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.
- D. 4x, wie unten beschrieben, waschen.
- E. **100 µl Konjugat** **CONJ** in alle Kavitäten außer Kavitäten **A1-A2** pipettieren.
- F. **15 Minuten** bei **+37 °C** unter Schütteln (**500 bis 800 rpm**) inkubieren.
- G. 4x, wie unten beschrieben, waschen.
- H. **100 µl Substrat** **SUB** in jede Kavität pipettieren; entweder Streifen 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 4 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 einem Behälter mit Desinfektionsmittel verwerfen;
- 300 µl der vorbereiteten Waschlösung (Abschnitt 8) in jede Kavität geben, die Platte für 5-10 Sekunden sorgfältig schütteln und den Überstand verwerfen, 4 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 0) gemessen = 2,28 und OD (Blank) = 0,06;  
 OD (Kalibrator 0) berechnet =  $2,28 - 0,06 = \underline{\underline{2,22}}$

### 13.4.1. Datenverlässlichkeit (für OD gemessen bei 450 nm)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

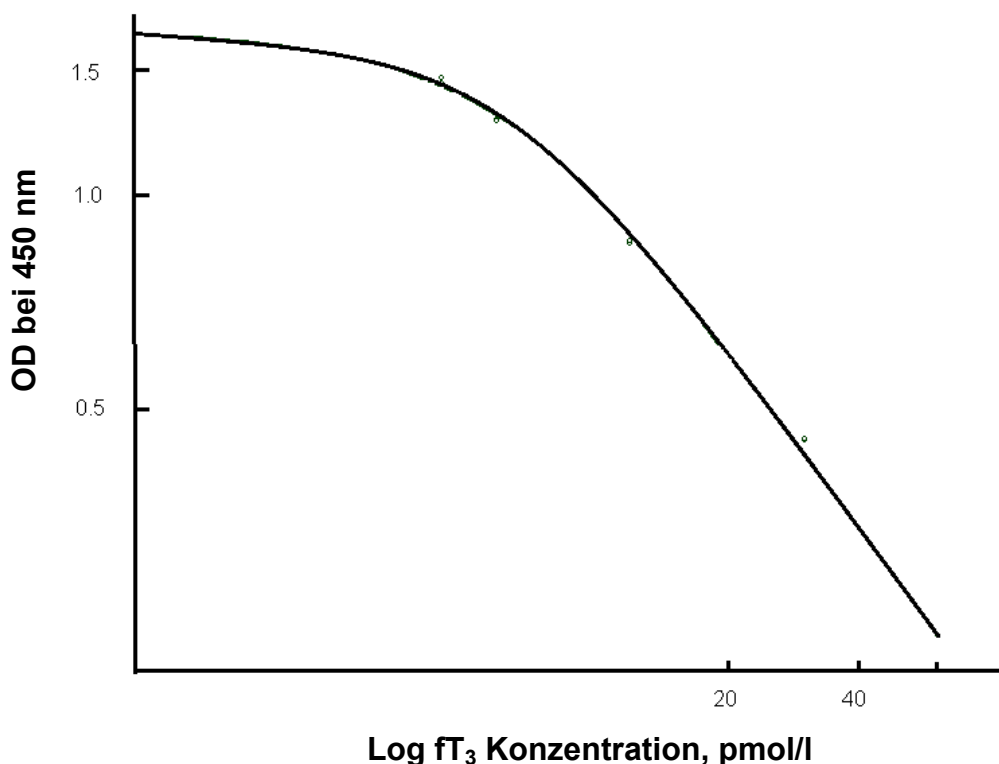
- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2)  $\leq 0,100$ ;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 0  $\geq 1,0$  (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Flaschenetikett angegebenen ist.

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 bei 450 nm werden gegen deren jeweilige freie  $T_3$ -Konzentration mittels **4PL oder 5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Konzentration des  $fT_3$  wird mit der Standardkurve berechnet.

Eine Extrapolation der Standardkurve für  $fT_3$ -Konzentrationswerte, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten (etwa 60 pmol/l), ist nicht zulässig.



*Abb.2 Typische Standardkurve*

**Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen**

### 13.5 Testschema

Kavität \ Reagenzien	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
	<b>ASSAYB</b>	–	80 µl
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
Inkubation №1	45 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	4 x 300 µl		
<b>CONJ</b>	–	100 µl	100 µl
Inkubation №2	15 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (verdünnt)	4 x 300 µl		
<b>SUB</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №3	15-30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-09 A)

### 14.1. Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten), beschichtet mit monoklonalen Anti-T3 –Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung mit T3 konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>ASSAYB</b>	<b>Analysenpuffer:</b> Protein-Puffer	12 ml, gebrauchsfertig
<b>0–5 CAL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> Kalibratoren:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter T3-Konzentration- 0; 1,5; 3; 10; 20; 60 pmol/l. Die exakten T3-Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	8 Fläschchen mit je 0,5 ml, <b>CAL</b> 1, 3- 2×0,5ml <b>CAL</b> 0, 2, 4, 5 - 1×0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> Kontrolle:</b> Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter T3-Konzentration. Der T3-Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	2 x 0,5 ml, gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>WASH P 20X</b>	<b>Waschlösung P, 20x konzentriert:</b> Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert
<b>SUB</b>	<b>Substrat (TMB-Lösung):</b> 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 M HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden

**Anmerkung:** Extra Fläschchen der **CAL** 1 und 3 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 Röhrchen 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

### 14.3. Testverfahren

Der **Free T<sub>3</sub> 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 deionisiertem Wasser:

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

Sorgfältig mischen, Schaumbildung vermeiden.

\* Reagenz ist nicht Teil des Kits und kann separat bezogen werden.



### **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, Waschschriffe, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der fT3-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4. Datenverarbeitung**

### **14.4.1. Datenverlässlichkeit (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 aufgrund der Verdunstung unmittelbar nach Beenden des Pipettiervorganges aus dem Automaten genommen werden, um einen 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 **Free T<sub>3</sub>** kit is provided for the **quantitative determination of free triiodothyronine (free T<sub>3</sub>)** in human serum.

This test has 2 complete sets:

**REF 24-09** for manual use,  
**REF 24-09 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:

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 test*

**REF 24-09A** *only on analyser “Alisei”,*

**REF 24-09** *only for manual use.*

*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) is one of the thyroid gland hormones with a molecular mass of 651 Da. L-Triiodothyronine circulates in blood almost completely bound (>99.5%) to carrier proteins. However, only the free T<sub>3</sub> is believed to be responsible for the biological action.

A free T<sub>3</sub> concentration level typically reflects actual thyroid status of the patient more adequately than the total T<sub>3</sub>

concentration alone because it doesn't depend on many clinical conditions such as pregnancy, oral contraceptives and steroid therapy. Quantitative determination of serum free  $T_3$  is significant for evaluation of thyroid gland function.

Measurement of free  $T_3$  concentration is most informative in cases of  $T_3$ -thyrotoxicosis, euthyroid sick syndrome, at generalized resistance to thyroid hormones, at classification of thyrotoxicoses on severity level and monitoring of antithyroid therapies.

Reduction of free  $T_3$  concentration can specify on primary, secondary, tertiary hypothyroidism. In certain cases decrease of free  $T_3$  level is observed at not thyroid diseases – noncompensated primary suprarenal insufficiency, heavy somatic and mental pathologies, in recovery period after a serious illness, at a low-calorie diet or a diet with the low maintenance of protein.

The raised free  $T_3$  level is observed at thyroiditis, a syndrome of resistance to thyroid hormones, TSH-independent thyrotoxicosis, at thyrotropinome and thyrotoxic adenoma, Graves' disease, isolated  $T_3$ -toxicosis. Besides, increase of free  $T_3$  level is possible at postnatal dysfunction of a thyroid gland, nephrotic syndrome, chronic diseases of a liver, after a hemodialysis.

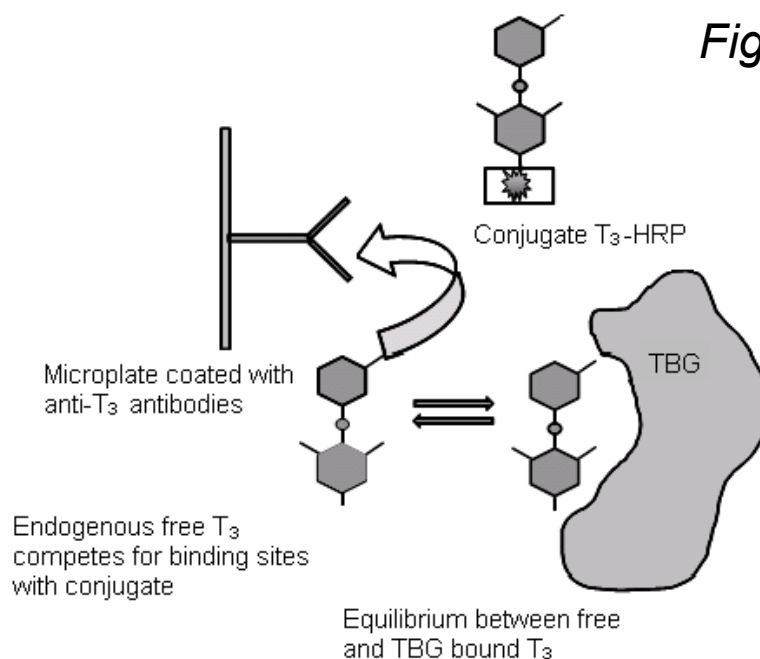
### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Free T3 kit** is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation free  $T_3$  of tested samples and horseradish peroxidase (HRP) labeled  $T_3$  bind to the antibodies coated onto the inner surface of the microplate wells until balance between them occurs.

Separation of free and bound to antibodies  $T_3$  and conjugate  $T_3$ -peroxidase occurs while extracting the contents of the wells.

The amount of bound conjugate is inversely proportional to the quantity of free  $T_3$  in the sample (fig. 1).

During the incubation with TMB solution the colour is developing. The intensity of the colour is inversely proportional to the free  $T_3$  concentration in specimens. The free  $T_3$  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 **Free T<sub>3</sub> 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 12 months.

After initial opening, the kit is stable until the expiration date if stored at +2...+8 °C.

If used in several separate experiments, after initial opening kit contents should be stored as follows:

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with assay buffer, conjugate, calibrators and control (ready-to-use): at +2...+8 °C until the expiration date; 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 the expiration date, protected from light;
- vials with concentrated Trial, concentrated wash solution and stop solution: 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 no more 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 in a tube without anticoagulants. Allow blood to clot. Centrifuge the specimens to separate serum from the blood corpuscles.

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 2 days. Aliquot and freeze the samples for a longer storage ( $\leq -20$  °C). Avoid repeated freezing.

## 6. EXPECTED VALUES

Range of free T<sub>3</sub> concentrations determined with **Free T3 kit** in serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 200 apparently healthy people (both males and females) at the age of 18–45 was 2.5 – 7.5 pmol/L. These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of free T<sub>3</sub> 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. Stir samples gently in order to ensure homogeneity.

## 10. PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF THE ASSAY

### 10.1. Calibration-Traceability:

The **Free T3 kit** was calibrated via commercially available diagnostic kit, which had been standardized using equilibrium dialysis.

### 10.2. Specificity:

Cross-reaction of anti-T<sub>3</sub> monoclonal antibodies with different thyroids is shown below:

Thyroid	Cross-reaction, %
Triiodothyronine	100
L-thyroxin	< 0.1
D-thyroxin	< 0.1
r-Triiodothyronine	< 0.1
Diiodotyrosine	< 0.1

### 10.3. Analytical Sensitivity:

Analytical sensitivity of **Free T3 kit**, i.e. concentration, that can be distinguished from zero calibrator is 0.5 pmol/L. It was defined as mean OD of 8 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

### 10.4. Measurement Range:

The **Free T3 kits** (Manual and Alisei kit) were validated for measurement of free T<sub>3</sub> concentration within the concentration diapason of 0.5 – 60 pmol/L.

### 10.5. Measurement Units:

In **Free T3 kit** the concentrations of calibrators are specified in pmol/L. To convert into pg/mL, multiply the concentration in pmol/L by 0.651.



## 10.6. Intra- and Inter-Assay Variation (Precision):

For **intra-assay CV** determination, 8 serum samples were run, each in 9 replicates. The results are shown below.

Manual kit

Sample	Mean free T <sub>3</sub> concentration, pmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	1.5	0.49	22.5
2	3.8	0.35	9.8
3	5.4	0.24	4.5
4	5.8	0.31	5.4
5	6.2	0.37	6.0
6	7.2	0.94	13.1
7	20.2	2.86	14.2
8	39.3	4.95	12.6

Alisei kit

Sample	Mean free T <sub>3</sub> concentration, pmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	0.8	0.08	10.1
2	2.1	0.18	8.7
3	3.3	0.30	9.1
4	4.9	0.17	3.5
5	6.4	0.20	3.1
6	10.5	0.27	2.6
7	24.0	2.74	11.4
8	38.0	5.12	13.5

For **inter-assay CV** determination, 8 serum samples were assayed 3 times by different operators with 1-week interval. Each specimen was run in 9 replicates. The results are shown below.

## Manual kit

Sample	Mean free T <sub>3</sub> concentration, pmol/L			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	1.75	1.84	1.66	0.232	14.0
2	1.82	1.77	1.32	0.275	16.8
3	3.70	3.54	4.25	0.372	9.7
4	5.62	5.50	5.26	0.183	3.4
5	6.14	6.27	5.93	0.233	3.8
6	8.06	7.8	8.2	1.201	14.9
7	20.81	18.6	17.2	1.321	7.0
8	39.0	36.2	41.4	4.897	12.6

## Alisei kit




Sample	Mean free T <sub>3</sub> concentration, pmol/L			Inter-assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	0.8	1.0	0.9	0.10	11.1
2	2.1	1.9	2.4	0.25	11.8
3	3.3	3.5	3.8	0.25	7.1
4	4.9	4.9	5.6	0.40	7.9
5	6.4	7.1	6.6	0.36	5.4
6	10.5	10.0	11.3	0.66	6.2
7	24.0	20.6	27.1	3.25	13.6
8	38.0	42.9	44.6	3.42	8.2

## 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 M 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 free T<sub>3</sub> concentration in the control.
- TMB solution should be colourless. Light colouring of solution is admissible. Avoid direct exposure of substrate to sunlight.
-  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**, **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. MANUAL TEST (REF 24-09)

### 13.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T <sub>3</sub> monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing T <sub>3</sub> conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>ASSAYB</b>	<b>Assay buffer:</b> protein-based solution	12 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known free T <sub>3</sub> concentrations – 0; 1.5; 3; 10; 20; 60 pmol/L. For exact free T <sub>3</sub> concentrations see vial labels	<b>6 vials,</b> 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known free T <sub>3</sub> concentration. For exact range of free T <sub>3</sub> concentration see vial label	0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>WASH   P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 560 mL of solution	2 x 14 mL, concentrated
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 M HCl solution	14 mL, ready to use

### 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/ 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 **Free T3 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

(Assay scheme, section 13.5)

- A. Pipette **80  $\mu$ L assay buffer** **ASSAYB** into all wells except A1-A2.
- B. Pipette **20  $\mu$ L** of **calibrators** **CAL** (0-5), **control** **CONTROL** and **patient's samples** in **duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- C. Incubate strips for **45 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C**.
- D. Wash 4 times, as described below.
- E. Pipette **100  $\mu$ L conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2**.
- F. Incubate strips for **15 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C**.
- G. Wash 4 times, as described below.
- H. Pipette **100  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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 4 wash cycles and a volume of 300  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 4 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 0) measured = 2.28 and OD (blank) = 0.06;

OD (Cal 0) calculated =  $2.28 - 0.06 = \underline{2.22}$

#### 13.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)

The data should meet the following criteria:

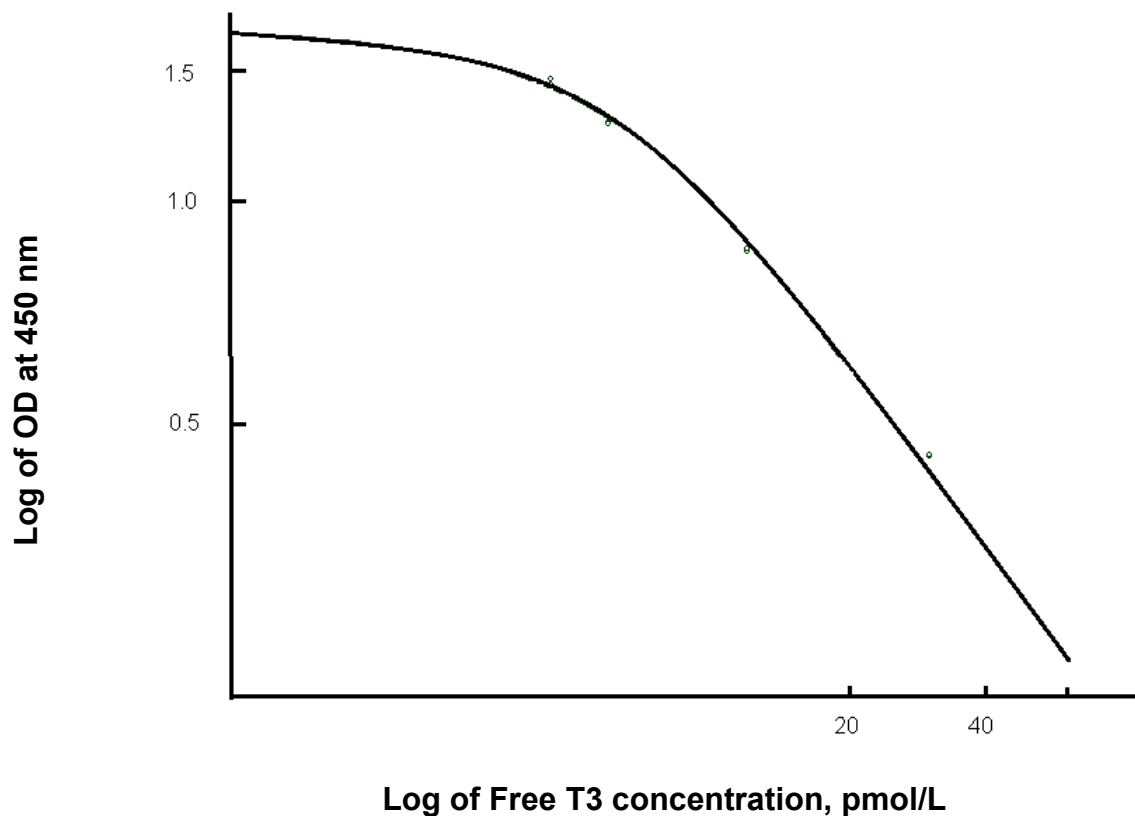
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 0  $\geq 1.0$  (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown on the vial label.

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 free T<sub>3</sub> concentrations using **4PL or 5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of free T<sub>3</sub> in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to free T<sub>3</sub> concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 60 pmol/L) is forbidden.



*Fig. 2 Example of typical standard curve*  
**Do not use for evaluation of real assay data!**

### 13.5. Assay scheme

Reagents	Wells		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Samples
<b>ASSAYB</b>	–	80 µL	80 µL
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µL	–
Samples	–	–	20 µL
Incubation No.1	45 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (diluted)	4 x 300 µL		
<b>CONJ</b>	–	100 µL	100 µL
Incubation No.2	15 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>WASH P</b> (diluted)	4 x 300 µL		
<b>SUB</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation №3	15-30 min, +18...+25 °C, in the dark		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C		
OD measuring	450 nm		
Calculations	Corresponding software		

## 14. AUTOMATIC TEST (REF 24-09 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T <sub>3</sub> monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing T <sub>3</sub> conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>ASSAYB</b>	<b>Assay buffer:</b> protein-based solution	12 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known free T <sub>3</sub> concentrations – 0; 1.5; 3; 10; 20; 60 pmol/L. For exact free T <sub>3</sub> concentrations see vial labels	<b>8 vials,</b> 0.5 mL each: <b>CAL</b> 1,3-2×0.5mL <b>CAL</b> 0,2,4,5- 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>Free T<sub>3</sub> control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known free T <sub>3</sub> concentration. For exact range of free T <sub>3</sub> concentration see vial label	2 × 0.5 mL, ready to use or lyophilized
<b>WASH P 20X</b>	<b>Wash solution P, 20X concentrated:</b> surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated
<b>SUB</b>	<b>Substrate (TMB solution):</b> 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution in citrate buffer containing hydrogen peroxide	14 mL, ready to use
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 M HCl solution	19 mL, ready to use
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial solution, 5000X concentrated:</b> solution of detergent	It is delivered by separate order

**Note:** Extra vials of **CAL** 1, 3 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 **Free T3 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”.

---

\* Reagent is not included in the kit, it is delivered by separate order.

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 procedure 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 free T3 concentration is hardwired in analyser memory.

## **14.4. Data Processing**

### **14.4.1. Data Reliability (OD measured at 450 nm)**

See criteria in section **13.4.1**.

## **14.5. Safety precautions**

- If kit for automatic analyser “Alisei” is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from automatic 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 a kit of any other lot, is not permitted.



February, 22, 2018



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