

Free T4 kit

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

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

Manueller Test / Manual test

Abschnitt / Section 13

Automatisierter Test / Automated test

Abschnitt / Section 14



Free T4 Kit (Manueller Test)
 Free T4 kit (manual test)



96 Untersuchungen
 96 tests

24-03



Free T4 Kit (Automatisierter
 Test für "Alisei")
 Free T4 kit (automated test
 for "Alisei")




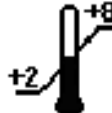

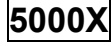






96 Untersuchungen
 96 tests

24-03 A



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
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Ausreichend für< n> Prüfungen Contains sufficient for <n> tests
			
	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		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Optische Dichte Optical density

2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Free T4 Testkit** ist für die **quantitative Bestimmung** von **freiem Thyroxin (fT₄)** in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

REF 24-03 Für den manuellen Gebrauch

REF 24-03 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 24-03 A nur für ELISA-Automat "Alisei",

REF 24-03 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.

Thyroxin (T₄) ist ein Schilddrüsenhormon mit einer Molekularmasse von 777 Da. Die quantitative Bestimmung der freien Thyroxin-Konzentration im Blut hat diagnostische Bedeutung bei der Beurteilung des Schilddrüsenzustandes.

Im Blutserum liegt das Thyroxin hauptsächlich in gebundenem Zustand vor. Die wichtigsten Thyroxin-bindenden Serumproteine sind das Thyroxin-bindende Globulin (TBG), das Thyroxin-bindende Präalbumin und das Albumin.

Die Konzentration des frei vorliegenden, nicht an Proteine gebundenen Thyroxins (fT_4) ist sehr gering, ca. 0,03% der gesamten zirkulierenden Menge. Es wird angenommen, dass nur die freie Form bioaktiv ist.

Die Konzentration des freien Thyroxins ist unabhängig von der Menge der bindenden Trägerproteine. Sie bleibt innerhalb eines Normbereiches konstant und zwar sowohl bei erhöhter (angeborene Pathologie, Schwangerschaft, Einnahme oraler Östrogene und Kontrazeptiven) als auch bei verringerter Konzentration des Thyroxin-bindenden Globulins (angeborene Pathologie, Einnahme von Androgenen oder Salizylaten, Nierenversagen) sowie bei einer Reduzierung des Proteinbindungsvermögens (Gebrauch von Salizylaten). Damit zeigt die Konzentration des freien T_4 den tatsächlichen Schilddrüsenstatus an. Bei einer Schilddrüsenüberfunktion oder der Einnahme von Thyroxin-Präparaten liegt die fT_4 -Konzentration über dem Normwert. Bei einer Schilddrüsenunterfunktion unterschreitet die Konzentration des freien T_4 den Normwert.

3. TESTPRINZIP

Der **Free T4 Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay. Während der Inkubation binden das freie T_4 der zu testenden Proben und das T_4 -HRP-Konjugat an die Antikörper, die an der Kavitätenoberfläche gebunden sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Beim anschließenden Leeren der Kavitäten wird das freie T_4 von dem an die Antikörper gebundenem T_4 und dem T_4 -Peroxidase-Konjugat getrennt. Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des freien T_4 in der Probe (Abb.1).

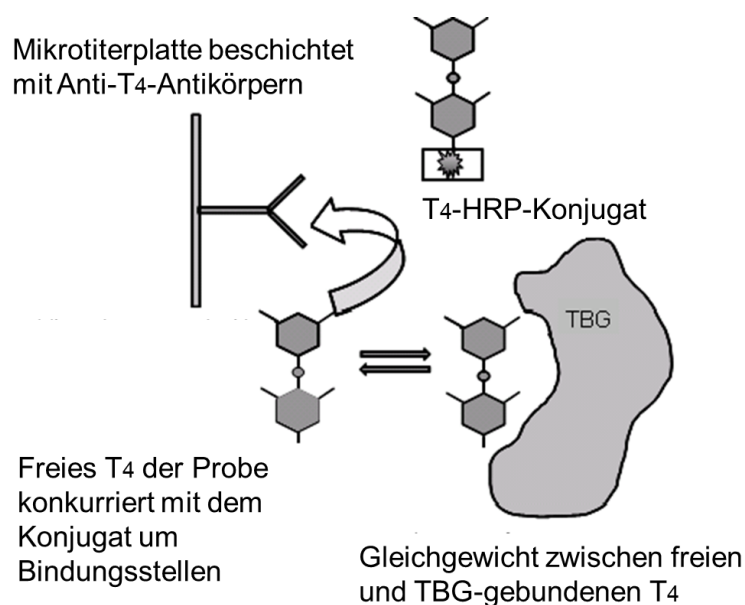


Abb. 1 Testschema

Während der Inkubation mit der TMB-Lösung entwickelt sich die Farbreaktion. Die Farbintensität ist indirekt proportional zur Konzentration des freien T4 der Probe. Die T4-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 T4 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 von +2...+8 °C bis 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 einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Konjugat, Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig): bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +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 des Trial- und des Waschpuffer-Konzentrates sowie 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 ≤ -20 °C gefroren zu lagern. Ein wiederholtes Einfrieren ist zu vermeiden.

6. REFERENZWERTE

Mit Hilfe des **Free T4 Testkits** wurden Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr morgens bei 200 gesunden, 18- bis 45-jährigen Probanden beider Geschlechter entnommen wurden, untersucht. Die ermittelten fT4-Konzentrationen lagen zwischen 10,0 – 23,2 pmol/l. Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die fT4-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 gebracht und gründlich gemischt werden.

MP Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur (+18...+25 °C) 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 lyophilisierten Kalibratoren und die 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, z.B.:

5 ml des **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 T4 Testkit** wurde mit Hilfe eines auf dem Markt erhältlichen Testkits kalibriert, der wiederum selbst mit Hilfe einer Gleichgewichtsdialyse kalibriert wurde.

10.2 Spezifität:

Die Kreuzreaktion der monoklonalen Anti-T4-Antikörper mit anderen Thyroiden ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Thyroid	Kreuzreaktion, %
L-Thyroxin	100,0
L- Triiodthyronin	8,0
L-Diiodthyrosin	0,001

10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Free T4 Testkits**, d.h. die Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 1,0 pmol/l.

Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

10.4 Messbereich:

Die **Free T4 Testkits** (manuelles und Alisei Testkit) sind validiert für die Detektion einer fT_4 -Konzentration innerhalb eines Bereiches von 1,0–100 pmol/l.

10.5 Messeinheiten:

Im **Free T4 Testkit** sind die Konzentrationswerte der Kalibratoren in pmol/l dargestellt. Für eine Umrechnung in ng/l muss der Konzentrationswert in pmol/l mit 0,777 multipliziert werden.

10.6 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 fT_4 -Konzentration, pmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	11,1	0,22	2,0
2	12,8	0,51	4,0
3	12,0	0,46	3,8
4	18,1	0,39	2,1
5	18,0	0,19	1,0
6	26,2	1,15	4,4
7	50,2	3,71	7,4
8	95,0	7,70	7,3

Alisei Testkit

Probe	Mittlere fT ₄ -Konzentration, pmol/l	Intra-assay VK	
		SD	VK, %
1	10,2	0,65	6,4
2	15,4	0,54	3,8
3	23,5	1,08	4,6
4	33,4	1,46	4,4
5	43,2	1,86	4,3
6	53,8	3,53	6,6
7	75,5	2,05	2,7
8	91,4	3,68	4,0

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 fT ₄ -Konzentration, pmol/l			Inter-assay VK	
	1.Test	2. Test	3.Test	SD	VK, %
1	11,1	11,1	10,2	0,52	4,8
2	12,8	12,4	11,5	0,66	5,4
3	12,0	12,5	11,2	0,66	5,5
4	18,1	18,3	16,9	0,76	4,3
5	18,0	17,8	17,1	0,48	2,7
6	26,2	25,1	24,2	1,01	4
7	50,2	50,2	44,8	3,10	6,4
8	95,0	96,9	88,1	6,22	6,7

Alisei Testkit

Probe	Mittlere fT ₄ -Konzentration, pmol/l			Inter-assay VK	
	1.Test	2. Test	3.Test	SD	VK, %
1	10,2	11,6	10,1	0,84	7,9
2	15,4	16,7	15,9	0,66	4,1
3	23,5	23,0	23,9	0,45	1,9
4	33,4	30,9	32,8	1,30	4,0
5	43,2	44,5	49,8	3,50	7,6
6	53,8	53,8	55,1	0,75	1,4
7	75,5	80,4	78,3	2,46	3,1
8	91,4	80,5	83,6	5,62	6,6

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 Waschlösung von Astra Biotech 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_4 -Konzentration der Kontrolle 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 24-03)

13.1. Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-T ₄ - Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung aus T ₄ konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Free T₄ Kalibratoren: Protein-basierte Lösungen oder Lyophilisate mit definierter fT ₄ -Konzentration – 0; 3; 6; 12; 30; 100 pmol/l. Die genauen fT ₄ -Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Free T₄ Kontrolle: Protein-basierte Lösung oder Lyophilisat mit definierter fT ₄ - Konzentration. Der fT ₄ -Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett 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 280 ml Lösung.	14 ml, konzentriert
STOP	Stopplösung: 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 T4 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. 20 µl Kalibratoren [CAL] (0-5), Kontrolle [CONTROL] und Patientenprobe in Doppelbestimmung in entsprechende Kavitäten pipettieren. 2 Kavitäten, A1-A2, bleiben frei (Blank)!**
- B. 150 µl Konjugat [CONJ] in alle Kavitäten außer A1-A2 pipettieren.**
- C. 60 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.**
- D. 4x, wie unten beschrieben, waschen.**
- E. 100 µl Substrat [SUB] in jede Kavität (auch Blank) pipettieren; Streifen entweder bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15–30 Minuten (abhängig von der Farbintensität) oder für 10 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500-800 rpm) inkubieren.**
- F. 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.**
- G. 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 bis 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 Kalibrator 0 $\geq 1,0$ (nach Blank Subtraktion);

- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Flaschenetikett angegeben 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 fT_4 -Konzentration mittels **4PL** oder **5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen.

Eine Extrapolation der Standardkurve für fT_4 -Konzentrationswerte, die die Konzentration in Kalibrator 5 überschreiten (etwa 100 pmol/l), ist nicht zulässig.

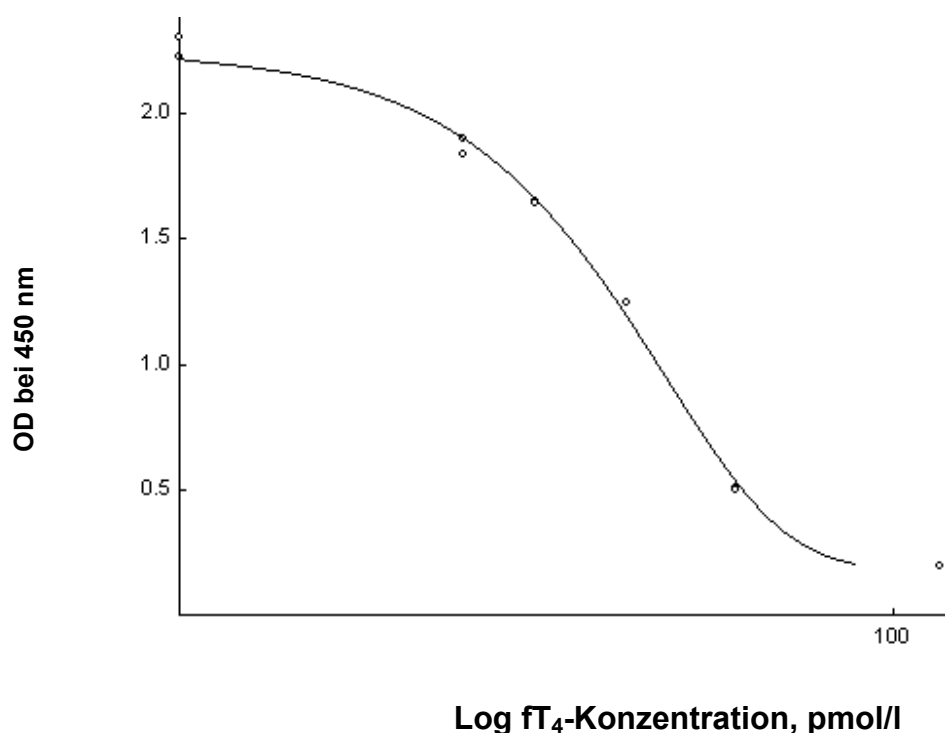


Abb.2 Typische Standardkurve

Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen

13.5 Testschema

Reagenzien	Kavitäten		
	«Blank»	CAL	Proben
CAL	–	20 µl	–
CONTROL			
Proben	–	–	20 µl
CONJ	–	150 µl	150 µl
Inkubation №1	60 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (verdünnt)	4 x 300 µl		
SUB	100 µl	100 µl	100 µl
Inkubation №2	15-30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 min, +37 °C, 500–800 rpm		
STOP	100 µl	100 µl	100 µl
Rühren	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-03 A)

14.1. Packungsinhalt

MP	Mikrotiterplatte: Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-T ₄ - Antikörpern	1 Platte
CONJ	Konjugat: Lösung mit T ₄ konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	18 ml, gebrauchsfertig
0-5 CAL	Free T₄ Kalibratoren: Protein-Puffer oder Lyophilisate mit definierter T ₄ -Konzentration- 0; 3; 6; 12; 30; 100 pmol/l. Die exakten T ₄ -Konzentrationen sind auf den Flaschenetiketten angegeben.	8 Fläschchen mit je 0,5 ml, CAL 2, 3 – 2 × 0,5 ml; CAL 0, 1, 4, 5 – 1 × 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
CONTROL	Free T₄ Kontrolle: Protein-Puffer oder Lyophilisat mit definierter T ₄ -Konzentration. Der T ₄ -Konzentrationsbereich ist auf dem Flaschenetikett angegeben.	2 x 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
SUB	Substrat (TMB-Lösung): 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Citrat-Puffer, mit Wasserstoffperoxid	14 ml, gebrauchsfertig
TRIAL 5000X	Trial-Lösung, 5000x konzentriert: Reinigungslösung	Muss separat bestellt werden
STOP	Stopplösung: 1 M HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
WASH P 20X	Waschlösung P, 20x, konzentriert: Tensid in Salzlösung, ausreichend für die Vorbereitung von 1000 ml Lösung.	50 ml, konzentriert

Anmerkung: Extra Fläschchen der **CAL** 2 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 12x 75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial solution, 5000x konzentriert*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser,
- Laborhandschuhe.

14.3. Testverfahren

Der **Free T4 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 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.
Astra Biotech

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, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der TSH-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 Testkits 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 **Free T₄** kit is provided for the **quantitative** determination of **free thyroxin (free T₄)** in human serum.

This test has 2 complete sets:

REF 24-03 for manual use,
REF 24-03 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 automated kit for “Alisei”.

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 24-03 A only on analyzer “Alisei”,
REF 24-03 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.

Thyroxin (T₄) is one of the thyroid gland hormones with a molecular mass of 777 Da. Quantitative determination of serum free thyroxin is significant for evaluation of thyroid gland function.

The bulk of serum T₄ persists in protein-bound form. The main T₄-binding proteins are thyroxin-binding globulin (TBG), thyroxin-binding prealbumin and albumin.

Concentration of non-bound form of T_4 (free T_4) is very low, approximately 0.03% of the total concentration of circulating hormone.

Namely free T_4 is considered to be responsible for biological activity of the hormone.

Free T_4 concentration does not depend on the concentration of binding proteins and remains normal when TBG levels are either increased (e.g. due to congenital pathology, pregnancy, intake of estrogens and oral contraceptives) or decreased (e.g. due to congenital pathology, intake of androgens and salicylates, renal insufficiency) and when the binding capacity of the proteins is diminished due to salicylates treatment. So, free T_4 level adequately reflects the actual thyroid status. Concentration of free T_4 is above normal in patients with thyroid hyperfunction or after intake of thyroxin preparations; it is below normal in the case of thyroid hypofunction.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

Free T_4 kit is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation free T_4 of tested samples and horseradish peroxidase (HRP) labeled T_4 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_4 and conjugate T_4 -peroxidase occurs while extracting the contents of the wells. The amount of bound conjugate is inversely proportional to the quantity of free T_4 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_4 concentration in specimens.

The free T_4 concentration in the patient sample is read from a standard curve that is processed in each assay.

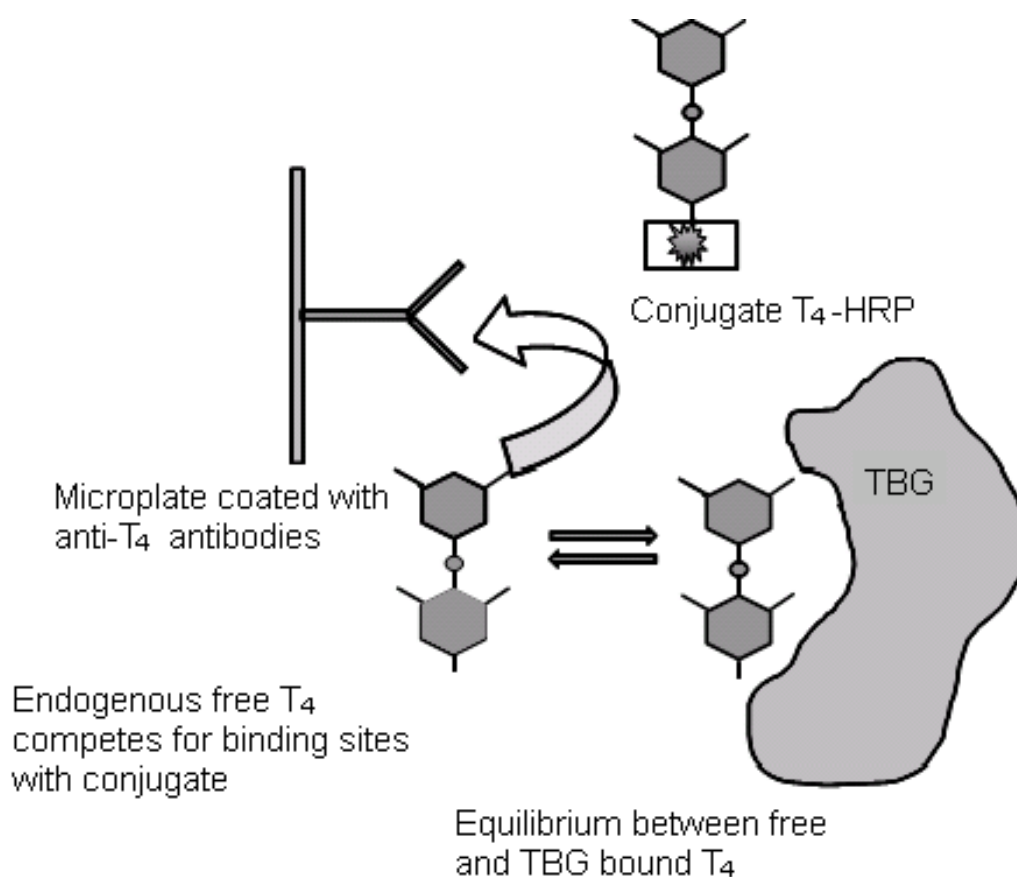


Fig. 1 Assay scheme

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_4 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 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 than 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 longer storage (≤ -20 °C). Avoid repeated freezing.

6. EXPECTED VALUES

Serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 200 apparently healthy people, both males and females, between the ages of 18–45, were assayed with **Free T4 kit**. Free T₄ concentration range in the samples was 10.0–23.2 pmol/L. These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of free T₄ 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, and then thoroughly stir.

MP Keep the **microplate** at room temperature (+18...+25 °C) 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

Free T4 kit was calibrated via commercially available diagnostic kit, which had been standardized using equilibrium dialysis.

10.2. Specificity

Cross-reaction of anti-T₄ monoclonal antibodies with different thyroids is shown below.

Thyroid	Cross-reaction, %
L-Thyroxin	100.0
L-Triiodothyronine	8.0
L-Diiodotyrosine	0.001

10.3. Analytical Sensitivity

Analytical sensitivity of **Free T4 kit**, i.e. concentration, which can be distinguished from zero calibrator is 1.0 pmol/L. It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

10.4. Measurement Range

The **Free T4 kits** (manual and Alisei kit) were validated for measurement of free T₄ concentration within the concentration diapason of 1.0 – 100 pmol/L.

Measurement Units

In **Free T4 kit** the concentrations of calibrators are specified in pmol/L. To convert into ng/L, multiply the concentration in pmol/L by 0.777.

10.5. 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 ₄ concentration, pmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	11.1	0.22	2.0
2	12.8	0.51	4.0
3	12	0.46	3.8
4	18.1	0.39	2.1
5	18	0.19	1.0
6	26.2	1.15	4.4
7	50.2	3.71	7.4
8	95.0	7.70	7.3

Alisei kit

Sample	Mean concentration of free T ₄ , pmol/L	Intra-assay CV	
		SD	CV, %
1	10.2	0.65	6.4
2	15.4	0.54	3.8
3	23.5	1.08	4.6
4	33.4	1.46	4.4
5	43.2	1.86	4.3
6	53.8	3.53	6.6
7	75.5	2.05	2.7
8	91.4	3.68	4.0

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 concentration of free T ₄ , pmol/L			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	11.1	11.1	10.2	0.52	4.8
2	12.8	12.4	11.5	0.66	5.4
3	12	12.5	11.2	0.66	5.5
4	18.1	18.3	16.9	0.76	4.3
5	18	17.8	17.1	0.48	2.7
6	26.2	25.1	24.2	1.01	4
7	50.2	50.2	44.8	3.10	6.4
8	95	96.9	88.1	6.22	6.7

Alisei kit



Sample	Mean concentration of free T ₄ , pmol/L			Inter-assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	10.2	11.6	10.1	0.84	7.9
2	15.4	16.7	15.9	0.66	4.1
3	23.5	23.0	23.9	0.45	1.9
4	33.4	30.9	32.8	1.30	4.0
5	43.2	44.5	49.8	3.50	7.6
6	53.8	53.8	55.1	0.75	1.4
7	75.5	80.4	78.3	2.46	3.1
8	91.4	80.5	83.6	5.62	6.6

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 T₄ concentration in the control.
- 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**, **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.

MANUAL TEST (REF 24-03)**13.1. Material Provided**

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T ₄ monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing T ₄ conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	Free T₄ calibrators: protein-based solutions or lyophilized preparations containing known free T ₄ concentrations – 0; 3; 6; 12; 30; 100 pmol/L. For exact free T ₄ concentrations see vial labels	6 vials, 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
CONTROL	Free T₄ control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known free T ₄ concentration. For exact range of free T ₄ concentration see vial label.	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 280 mL of solution	14 mL, concentrated
STOP	Stop solution: 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 T4 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 **20 µL** calibrators **CAL** (0-5), control **CONTROL** and **patient's samples in duplicates** into the respective wells; **Leave wells A1-A2 empty for blank!**
- B.** Pipette **150 µL** of conjugate **CONJ** into each well, **except wells A1-A2.**
- C.** Incubate strips for **60 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C.**
- D.** Wash 4 times, as described below.
- E.** Pipette **100 µL** substrate **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500-800 rpm) at +37 °C.**
- F.** 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.**
- G.** 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 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 μ 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) ≤ 0.100 ;
- average OD of Cal 0 ≥ 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_4 concentrations using **4PL or 5PL fit** (Fig. 2 Typical standard curve). Calculate concentration of free T_4 in samples using standard curve.

Any extrapolation of the standard curve to free T_4 concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 100 pmol/L) is forbidden.

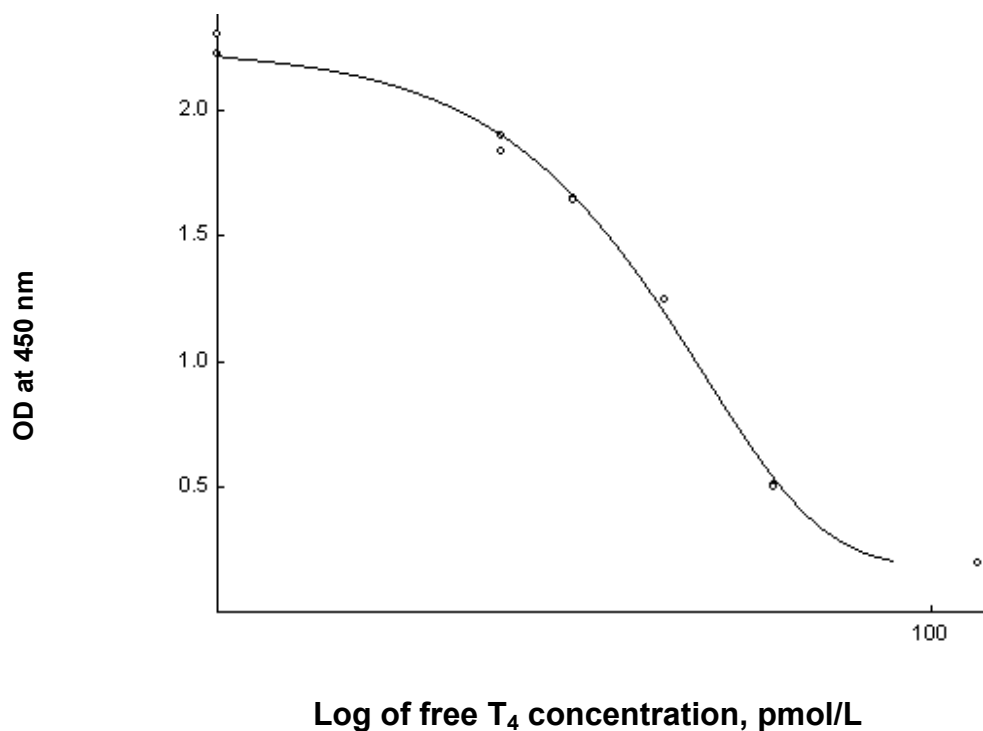


Fig. 2 Example of typical standard curve
Do not use for evaluation of real assay data!

13.5. Assay scheme

Reagents \ Wells	«Blank»	CAL CONTROL	Samples
CAL CONTROL	–	20 µL	–
Samples	–	–	20 µL
CONJ	–	150 µL	150 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm		
WASH P (diluted)	4 x 300 µL		
SUB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubation No.2	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 24-03A)

14.1. Material Provided

MP	Microplate: 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T ₄ monoclonal antibodies	1 pcs
CONJ	Conjugate: solution containing T ₄ conjugated with HRP	18 mL, ready to use
0-5 CAL	Free T₄ calibrators: protein-based solutions or lyophilized preparations containing known free T ₄ concentrations- 0; 3; 6; 12; 30; 100 pmol/L. For exact free T ₄ concentrations see vial labels	8 vials, 0.5 mL each: CAL 2, 3 – 2 × 0.5 mL; CAL 0, 1, 4, 5 – 1 × 0.5 mL; ready to use or lyophilized
CONTROL	Free T₄ control: protein-based solution or lyophilized preparation containing known free T ₄ concentration. For exact range of free T ₄ concentration see vial label	2 × 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
TRIAL 5000X	Trial solution, 5000X concentrated: solution of detergent	It is delivered by separate order
STOP	Stop solution: 1 M HCl solution	19 mL, ready to use
WASH P 20X	Wash solution P, 20X concentrated: surfactant in buffered saline, sufficient for preparation of 1000 mL of solution	50 mL, concentrated

Note: Extra vials of **CAL** 2, 3 and **CONTROL** are provided for recalibration on reference calibration curve. For detailed information see instructions for use for analyzer "Alisei".

14.2. Equipment and Materials Required but not provided

- Automatic analyzer for ELISA kits on microplate (analyzer “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

Free T4 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, 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 analyzer. 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.

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

14.3.2. Assay Procedure for Automatic Test

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

The analysis on EIA analyzer “Alisei” is completely automatic: pipetting of reagents, washing, incubation, OD measurement, analysis of results. The program of calculation free T4 concentration is hardwired in analyzer 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 analyzer is used in several separate experiments it is necessary to take reagents from automatic analyzer 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.

April, 12, 2018



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