

# Thyroxin kit

ELISA Testkit zur quantitativen Bestimmung  
 von Thyroxin (T4) in humanem Blutserum  
*(Gebrauchsanweisung: Seite 3)*

Enzyme immunoassay for quantitative  
 determination of thyroxin (T4) in human serum  
*(Instructions for use: page 266)*

Manueller Test / Manual test

*Abschnitt / Section 13*

Automatisierter Test / Automated test

*Abschnitt / Section 14*

**IVD**

Thyroxin Kit (Manueller Test)  
 Thyroxin kit (manual test)



96 Untersuchungen  
 96 tests

**24-05**

**REF**

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















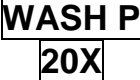











96 Untersuchungen  
 96 tests

**24-05 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
	Auflösen mit angegebenem Volumen Reconstitute with specified volume of liquid		Konjugat Conjugate
	Beschichtete Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) Coated microplate (96 wells)		Substrat Substrate
	Waschlösung, 20x konzentriert Wash solution, 20X concentrated		Stopplösung Stop solution
	Kalibratoren Calibrators		Optische Dichte Optical density
	Ausreichend für < n > Prüfungen Contains sufficient for <n> tests		8- Anilino-1-Naphthalin-sulfonsäure Ammoniumsalz-Lösung Solution of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt
	Kontrolle Control		Deionisiertes, destilliertes Wasser Deionized or distilled water
	Trial-Lösung, 5000x konzentriert Trial, 5000X concentrated		Reizend Irritant

**Warning**

## 2. VERWENDUNGSZWECK

Der **Thyroxin Testkit** ist für die **quantitative** Bestimmung des gesamten **Thyroxins (T<sub>4</sub>)** in **humanem Blutserum** bestimmt.

Der Testkit ist in zwei Variationen erhältlich:

**REF 24-05** Für den manuellen Gebrauch

**REF 24-05 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 24-05 A** *nur für ELISA-Automat "Alisei"*

**REF 24-05** *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.*

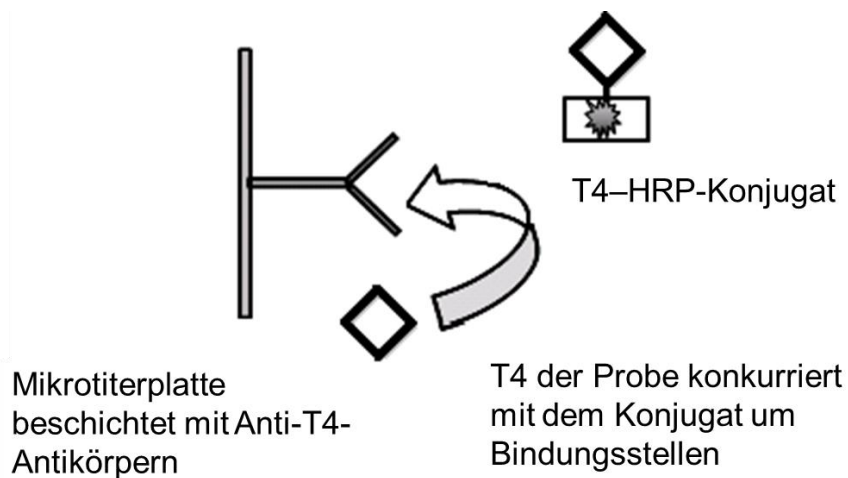
T<sub>4</sub> ist ein Schilddrüsenhormon mit einer Molekularmasse von 777 Da. Die quantitative Bestimmung des Thyroxins im Serum hat eine wichtige diagnostische Bedeutung bei der Beurteilung des Schilddrüsenzustandes.

### 3. TESTPRINZIP

Der **Thyroxin Testkit** ist ein kompetitiver Festphasen-Immunoassay.

Während der Inkubation binden sowohl das  $T_4$  der zu testenden Probe als auch das Meerrettich Peroxidase (HRP) gebundene  $T_4$  an die Antikörper, die an der festen Phasen der Mikrotiterplatten gekoppelt sind, bis sich ein Gleichgewicht einstellt.

Beim Leeren der Kavitäten wird freies  $T_4$  von dem an die Antikörper gebundenem  $T_4$  und dem  $T_4$ -HRP-Konjugat getrennt. Dabei ist die Menge des gebundenen Konjugates umgekehrt proportional zur Menge des  $T_4$  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  $T_4$  der Probe.

Die  $T_4$ -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 **Thyroxin Kit** ist nach dem Empfang bei +2...+8 °C in der Originalverpackung des Herstellers bis zum Ablauf der Haltbarkeit zu lagern. Eine Lagerung bei Temperaturen bis +25 °C ist maximal für 5 Tage zulässig.

Die Haltbarkeitsdauer des Kits beträgt 18 Monate.

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

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

- Die ungenutzten Mikrotiterplatten-Streifen: in einem fest verschlossenen Druckverschlussbeutel: bei +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gebrauchsfertig) und Konjugat: bei +2...+8 °C für 12 Monate;
- Fläschchen mit Kalibratoren und Kontrolle (gelöst aus Lyophilisat): bei +2...+8 °C für maximal 1 Monat nach dem Öffnen;
- Fläschchen mit Substrat-Lösung und ANSA-T<sub>4</sub>-Lösung: bei einer Temperatur von +2...+8 °C bis zum Verfallsdatum; **lichtgeschützt**;
- Fläschchen der konzentrierten Trial- und Waschlösung und 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 lipämische (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 **Thyroxin Kit** ermittelte T<sub>4</sub>-Konzentrationsbereich von 40 Blutserumproben, die von 9 bis 11 Uhr morgens bei gesunden 21- bis 45-Jährigen beider Geschlechter entnommen wurden, lag zwischen 53 -158 nmol/l (Mittelwert: 98 nmol/l). Der angegebene Bereich dient jedoch nur als eine Orientierungshilfe.

Es wird ausdrücklich empfohlen, dass jedes Labor einen eigenen Referenzbereich für die T<sub>4</sub>-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** Mikrotiterplatte

Die Verpackung mit der **Mikrotiterplatte** vor der Öffnung mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur lagern und anschließend wie folgt vorbereiten:

- 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 Waschlösung**

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.

**ANSA-T4 ANSA-T<sub>4</sub>-Lösung** vor direktem Licht schützen.



## 9. PROBENVORBEREITUNG

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

## 10. TESTCHARAKTERISTIKA

### 10.1 Kalibrierung:

Der **Thyroxin Testkit** wurde gegen einen Arbeitsstandard, welcher nach gravimetrischer Methode basierend auf dem Abwiegen von aufgereinigtem, synthetischem T<sub>4</sub> in einer analytenfreien Matrix hergestellt wurde, kalibriert.

### 10.2 Spezifität:

Die Kreuzreaktion der monoklonalen Anti-T<sub>4</sub>-Antikörper mit anderen Schilddrüsenhormonen ist in folgender Tabelle dargestellt:

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

### 10.3 Analytische Sensitivität:

Die analytische Sensitivität des **Thyroxin Testkits**, d.h. die Konzentration, die sich vom Kalibrator 0 sicher unterscheiden lässt, beträgt 10 nmol/l (manuelles und Alisei Testkit). Zur Ermittlung wurde der Mittelwert einer 10fach-Bestimmung der OD des Kalibrators 0 unter Berücksichtigung der Standardabweichung (minus 2 SD) gebildet.

## 10.4 Messbereich:

Der **Thyroxin Testkit** ist für die Detektion eines T<sub>4</sub>-Konzentrationsbereiches von 10 bis 400 nmol/l validiert (manuelles und Alisei Testkit).

## 10.5 Messeinheit:

Im **Thyroxin Testkit** sind die Konzentrationen der Kalibratoren in nmol/l dargestellt. Für eine Umrechnung in µg/dl muss der Konzentrationswert in nmol/l mit 0,0777 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 T <sub>4</sub> - Konzentration, nmol/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	95	4,2	4,4
2	107	5,4	5,0
3	111	2,9	2,6
4	124	5,9	4,8
5	127	5,3	4,2
6	134	7,9	5,9
7	130	6,0	4,6
8	149	6,9	4,6

## Alisei Testkit

Probe	Mittlere T <sub>4</sub> -Konzentration, nmol/l	Intra-Assay VK	
		SD	VK, %
1	88	2,8	3,1
2	125	4,4	3,5
3	142	6,6	4,7
4	167	6,6	3,9
5	191	7,8	4,1
6	226	4,8	2,1
7	253	4,7	1,9
8	274	9,9	3,6

Um einen **Inter-Assay Variationskoeffizient** festzulegen, wurden 8 Blutserumproben dreimal mit einem Intervall von 1 Woche von verschiedenen Anwendern untersucht. Jede Probe wurde 9 Mal gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle dargestellt:

## Manuelles Testkit

Probe	Mittlere T <sub>4</sub> -Konzentration, nmol/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	98	103	95	4,0	4,1
2	101	107	100	3,8	3,7
3	104	109	98	5,5	5,3
4	107	113	102	5,5	5,1
5	112	122	103	9,5	8,5
6	123	132	118	7,1	5,7
7	136	139	125	7,4	5,5
8	147	157	143	7,2	4,8

## Alisei Testkit

Probe	Mittlere T <sub>4</sub> -Konzentration, nmol/l			Inter-Assay VK	
	1. Test	2. Test	3. Test	SD	VK, %
1	88	95	97	4,7	5,1
2	125	139	130	7,1	5,4
3	142	148	156	7,0	4,7
4	167	179	185	9,2	5,2
5	191	210	215	12,7	6,2
6	226	253	245	13,9	5,7
7	253	236	240	8,9	3,7
8	274	259	291	16,0	5,8





## 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 N Salzsäure (HCl-Lösung). Vermeiden Sie Haut- und Schleimhautkontakt. Bei Haut- oder Schleimhautkontakt den betroffenen Bereich mit fließendem Wasser spülen und gegebenenfalls einen Arzt aufsuchen.
- Bitte folgende bekannte Verfahrensregeln beachten:
  - Reagenzien unmittelbar nach dem Waschen in die Kavitäten pipettieren;
  - Kontamination der Lösungen vermeiden;
  - Bei teilweiser Nutzung des Testkits nur benötigtes Volumen in ein gesonderten Behälter geben, nicht benutzte Reagenzien NICHT zurück in die ursprünglichen Original-Fläschchen füllen;
  - Direkte Sonneneinstrahlung während der Inkubation vermeiden;
  - Reagenzien in gleicher Reihenfolge pipettieren, um Unterschiede in den Reaktionszeiten zwischen den Kavitäten zu vermeiden. Die gesamte Pipettierzeit für Kalibratoren, Kontrolle und Proben darf 15 Minuten nicht überschreiten;

- Die Temperatur der Inkubation aller 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 T<sub>4</sub>-Konzentration der Kontrolle zu bestimmen;
  - Entfernen Sie die Klebeschutzfolie vorsichtig um eine Kontamination zu vermeiden und verwenden Sie dieselbe Klebeschutzfolie nicht erneut.
- Die TMB-Lösung sollte farblos sein. Eine helle Färbung der Lösung ist zulässig. Vermeiden Sie direkte Sonneneinstrahlung des Substrates;
  -  Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanen Ursprungs sind, ergaben bei der Prüfung auf HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) bzw. Antikörper gegen HIV („Human Immunodeficiency Virus“) und HCV (Hepatitis C Virus) ein negatives Ergebnis. Dennoch kann das Vorhandensein infektiöser Erreger durch keinen Test mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Reagenzien und 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.

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



Der Testkit beinhaltet Reizstoffe (**CONJ**, **ANSA-T3**, **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 24-05)

### 13.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-T <sub>4</sub> -Antikörpern.	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus T <sub>4</sub> konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>ANSA-T<sub>4</sub></b>	<b>ANSA-T<sub>4</sub> Lösung:</b> Lösung aus gepufferten 8-Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure-Ammoniumsalz	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>T<sub>4</sub> Kalibratoren:</b> Protein-basierte Lösung oder Lyophilisate mit definierter T <sub>4</sub> -Konzentration – 0; 15; 30; 60; 150; 400 nmol/l (ungefähre Werte - verwenden Sie die Daten nicht für die Auswertung des Assays). Die Konzentrationen der Kalibratoren können sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Die exakten Lot spezifischen T <sub>4</sub> -Konzentrationen sind im Quality Control Sheet angegeben.	6 Fläschchen, je 0,5 ml gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTR OL</b>	<b>T<sub>4</sub> Kontrolle:</b> Protein -basierte Lösung oder Lyophilisat mit definierter T <sub>4</sub> -Konzentration. Der Konzentrationsbereich kann sich zwischen Protokoll 1 und 2 unterscheiden. Der Lot spezifische T <sub>4</sub> -Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet 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.	2x14 ml, konzentriert
<b>STOP</b>	<b>Stopplösung:</b> 1 N HCl - Lösung	14 ml, gebrauchsfertig
	<b>Klebeschuttfolie</b>	2x1 Folie (optional)



## 13.2 Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Equipment

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

## 13.3 Testablauf

Der **Thyroxin Kit** 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 Assay-Durchführung

**Anmerkung:** Bitte überprüfen Sie auf dem mit dem Kit gelieferten Quality Control Sheet, für welches Assay-Protokoll Ihr Kit validiert wurde. Wenn Ihr Kit für das Assay Protocol 1 validiert wurde, folgen Sie bitte dem unten beschriebenen

*Assay Protocol 1. Wenn Ihr Kit zusätzlich für das Assay Protocol 2 validiert wurde, beachten Sie bitte die Ergänzung 1 zu der mit dem Kit gelieferten Gebrauchsanweisung.*

## **Assay-Protokoll 1**

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

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

- A. 100 µl ANSA-T<sub>4</sub>-Lösung** **ANSA-T<sub>4</sub>** in alle Kavitäten (außer A1-A2) pipettieren.
- B. 20 µl der Kalibratoren** **CAL** (0-5), **Kontrolle** **CONTROL** und **Serumproben in Zweifachbestimmung** in entsprechende Kavitäten pipettieren. 2 Kavitäten, **A1-A2, bleiben frei** («Blank»)!
- C. 100 µl Konjugat** **CONJ** in alle Kavitäten, **außer A1-A2,** pipettieren.

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

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

- D. 60 Minuten bei +37 °C unter Schütteln (500 bis 800 rpm) inkubieren.**

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

- E. 4x, wie unten beschrieben, waschen.
- F. **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.
- G. **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**.
- H. 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 =  $2,28 - 0,06 = \underline{2,22}$

### 13.4.1 Datenverlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)

Die Daten sollten folgende Kriterien erfüllen:

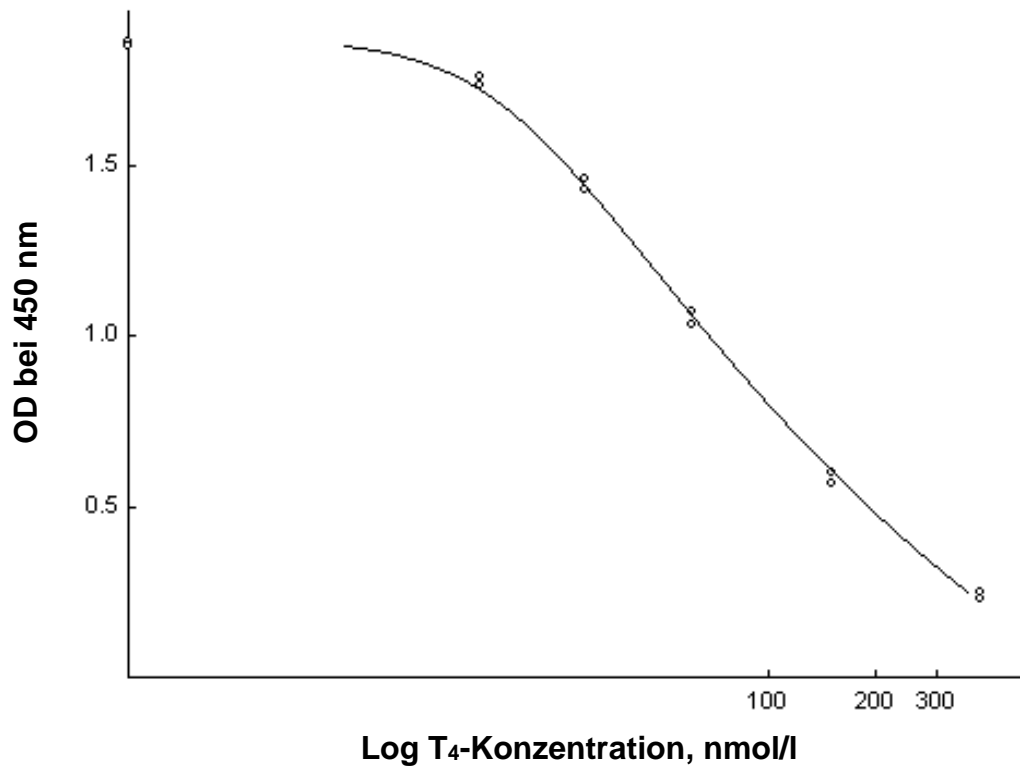
- Mittelwert der OD des Blank (der Kavitäten A1-A2)  $\leq 0,100$ ;
- Mittelwert der OD des Kalibrators 0  $\geq 1,0$  (nach Blank Subtraktion);
- Konzentration der Kontrolle muss innerhalb des Bereiches liegen, welcher auf dem Quality Control Sheet angegebenen ist.

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

### 13.4.2 Quantitative Bestimmung

Eine spezialisierte Software zur quantitativen Bestimmung wird empfohlen. Die Mittelwerte der OD der Kalibratoren werden gegen deren jeweilige T<sub>4</sub>-Konzentration mittels **4PL** oder **5PL Näherung** (Abb. 2 Typische Standardkurve) aufgetragen. Die Konzentration des T<sub>4</sub> wird mit der Standardkurve berechnet.

Eine Extrapolation der Standardkurve für T<sub>4</sub>-Konzentrationen, die die Konzentration des Kalibrators 5 überschreiten (etwa 400 nmol/l), ist nicht zulässig.



*Abb. 2 Typische Standardkurve*  
**Beispielstandardkurve! Nicht zur Auswertung benutzen**

## 13.5 Assay-Schema zum Assay-Protokoll 1

Reagenzien	Kavität		
	«Blank»	<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	Proben
<b>ANSA-T4</b>	–	100 µl	100 µl
<b>CAL</b> <b>CONTROL</b>	–	20 µl	–
Proben	–	–	20 µl
<b>CONJ</b>	–	100 µl	100 µl
Inkubation №1	60 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 №2	15-30 Min, +18...+25 °C, im Dunkeln		
	10 Min, +37 °C, 500–800 rpm		
<b>STOP</b>	100 µl	100 µl	100 µl
Schütteln	1–2 Min, +18...+25 °C		
OD-Messung	450 nm		
Berechnung	Spezielle Software		

## 14. AUTOMATISIERTER TEST (REF 24-05 A)

### 14.1 Packungsinhalt

<b>MP</b>	<b>Mikrotiterplatte:</b> Zwölf Streifen mit acht Kavitäten (insgesamt 96 Kavitäten) beschichtet mit monoklonalen Anti-T <sub>4</sub> -Antikörpern	1 Platte
<b>CONJ</b>	<b>Konjugat:</b> Lösung aus T <sub>4</sub> konjugiert mit Meerrettich Peroxidase (HRP)	14 ml, gebrauchsfertig
<b>ANSA-T4</b>	<b>ANSA-T<sub>4</sub> Lösung:</b> Lösung aus gepuffertem 8-Anilino-1-Naphthalinsulfonsäure-Ammoniumsalz	14 ml, gebrauchsfertig
<b>0-5 CAL</b>	<b>T<sub>4</sub> Kalibratoren:</b> Protein-basierte Lösung oder Lyophilisate mit definierter T <sub>4</sub> -Konzentration – 0; 15; 30; 60; 150; 400 nmol/l (ungefähre Werte- bitte nicht für die Auswertung von realen Testdaten verwenden). Für Lot spezifische T <sub>4</sub> -Konzentrationen siehe Werte im Quality Control Sheet.	<b>8 Fläschchen</b> , je 0,5 ml <b>CAL</b> 2,3- 2×0,5ml; <b>CAL</b> 0, 1, 4, 5 – 1× 0,5 ml; gebrauchsfertig oder lyophilisiert
<b>CONTROL</b>	<b>T<sub>4</sub> Kontrolle:</b> Protein-basierte Lösung oder Lyophilisat mit definierter T <sub>4</sub> -Konzentration. Der T <sub>4</sub> -Konzentrationsbereich ist im Quality Control Sheet angegeben.	2x 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 N HCl-Lösung	19 ml, gebrauchsfertig
<b>TRIAL 5000X</b>	<b>Trial-Lösung, 5000x konzentriert:</b> Reinigungslösung	Ist separat zu beziehen

**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 12x75, Volumen: 5,5 ml;
- **TRIAL 5000X** Trial-Lösung, 5000x konzentriert\*;
- Deionisiertes oder destilliertes Wasser;
- Laborhandschuhe.

### 14.3 Testverfahren

Der **Thyroxin 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, Waschschritte, Inkubation, OD-Messung und Analyse der Testergebnisse. Das Programm zur Berechnung der T<sub>4</sub>-Konzentration ist im Gerät ebenfalls enthalten.

## **14.4 Datenverarbeitung**

### **14.4.1 Datenverlässlichkeit (OD<sub>450 nm</sub>)**

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 **Thyroxin kit** is provided for the **quantitative** determination of **total thyroxin (T<sub>4</sub>)** in human serum.

This test has 2 complete sets:

**REF 24-05** for manual use,  
**REF 24-05 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 24-05 A** only on analyser “Alisei”,  
**REF 24-05** only for manual use.

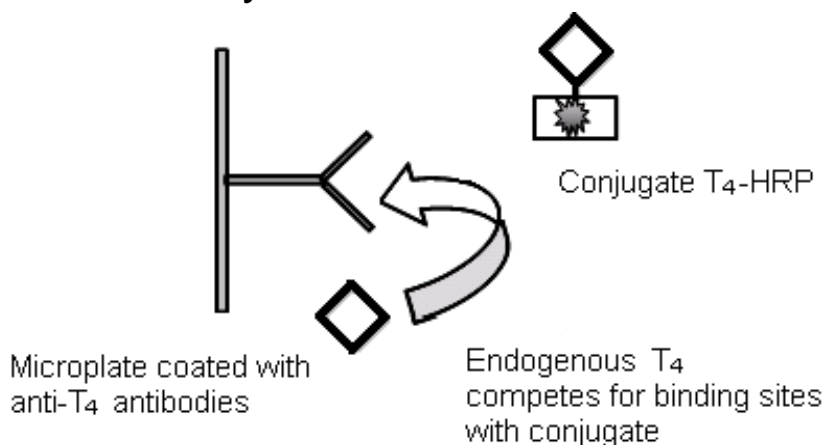
*While using non predefined methods of use, it is under end user responsibility, to make sure that it was appropriately tested for ELISA kits.*

T<sub>4</sub> is one of the thyroid gland hormones with a molecular mass of 777 Da. Quantitative determination of serum thyroxin is significant for evaluation of thyroid gland function.

### 3. PRINCIPLE OF THE TEST

The **Thyroxin kit** is a competitive solid phase enzyme immunoassay. During the incubation  $T_4$  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  $T_4$  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  $T_4$  concentration in specimens. The  $T_4$  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 **Thyroxin kit** should be stored at +2...+8 °C upon receipt, preferably in the original kit box, until the expiration date. Storage at +25 °C is allowed but for no more than 5 days.

Shelf life of the kit is 18 months.

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

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

- unused strips: in a firmly closed resealable zipper bag at +2...+8 °C until the expiration date;
- vials with calibrators and control (ready-to-use) and conjugate: at +2...+8 °C for 12 months; vials with calibrators and control (reconstituted): at +2...+8 °C for no more than 1 month after opening;
- vials with substrate and ANSA-T<sub>4</sub> solution: 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 maximal 4 weeks in a firmly closed bottle;
- Trial solution prepared for use: at room temperature (+18...+25 °C) for no more than 5 days, in a firmly closed bottle.

### **Damaged Test Kits**

In case of any severe damage of the test kit or components, Astra Biotech GmbH has to be informed in writing, during one

week after receiving the kit. Usage of severely damaged single components for a test run is not recommended.

## 5. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

Collect blood by venipuncture 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 T<sub>4</sub> concentrations determined with **Thyroxin kit** in serum samples collected between 9 and 11 a.m. from 40 apparently healthy people (both males and females) at the age of 21–45 was 53-158 nmol/L (mean 98 nmol/L). These limits should be considered as guidelines only.

It is highly recommended each laboratory to determine its own reference range of T<sub>4</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** Microplate

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** Wash solution

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 of water

Mix thoroughly, avoid foaming.

### **SUB** Substrate

Protect **substrate** from direct light.

**ANSA-T<sub>4</sub> ANSA-T<sub>4</sub> solution**

Protect **ANSA-T<sub>4</sub> solution** 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 **Thyroxin kit** was calibrated against the Working Standard, which had been manufactured by gravimetric method based on weighing purified synthetic thyroxin into analyte-free matrix.

**10.2 Specificity:**

Cross-reaction of anti-T<sub>4</sub> monoclonal antibodies with different thyroids is shown below.

<b>Thyroid</b>	<b>Cross-reaction, %</b>
L-Thyroxin	100.0
L-Triiodothyronine	8.0
L-Diiodotyrosine	0.001

**10.3 Analytical Sensitivity:**

Analytical sensitivity of **Thyroxin kit**, i.e. concentration that can be distinguished from zero calibrator is 10 nmol/L (for manual and Alisei kits). It was defined as mean OD of 10 replicates of calibrator 0 minus 2 SD.

## 10.4 Measurement Range:

The **Thyroxin kit** was validated for measurement of T<sub>4</sub> concentration within the concentration diapason of 10–400 nmol/L (for manual and Alisei kits).

## 10.5 Measurement Units:

In **Thyroxin kit** the concentrations of calibrators are specified in nmol/L. To convert into µg/dL, multiply the concentration in nmol/L by 0.0777.

## 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 kits

Sample	Mean T <sub>4</sub> concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	95	4.2	4.4
2	107	5.4	5.0
3	111	2.9	2.6
4	124	5.9	4.8
5	127	5.3	4.2
6	134	7.9	5.9
7	130	6.0	4.6
8	149	6.9	4.6



## Alisei kit

Sample	Mean thyroxin concentration, nmol/L	Intra-Assay CV	
		SD	CV, %
1	88	2.8	3.1
2	125	4.4	3.5
3	142	6.6	4.7
4	167	6.6	3.9
5	191	7.8	4.1
6	226	4.8	2.1
7	253	4.7	1.9
8	274	9.9	3.6

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 T <sub>4</sub> concentration, nmol/L			Inter-Assay CV	
	Assay 1	Assay 2	Assay 3	SD	CV, %
1	98	103	95	4.0	4.1
2	101	107	100	3.8	3.7
3	104	109	98	5.5	5.3
4	107	113	102	5.5	5.1
5	112	122	103	9.5	8.5
6	123	132	118	7.1	5.7
7	136	139	125	7.4	5.5
8	147	157	143	7.2	4.8

## Alisei kit





Sample	Mean thyroxin concentration, nmol/L			Inter-Assay precision	
	1 assay	2 assay	3 assay	SD	CV, %
1	88	95	97	4.7	5.1
2	125	139	130	7.1	5.4
3	142	148	156	7.0	4.7
4	167	179	185	9.2	5.2
5	191	210	215	12.7	6.2
6	226	253	245	13.9	5.7
7	253	236	240	8.9	3.7
8	274	259	291	16.0	5.8

## 11 LIMITATION OF THE METHOD

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

## 12 SAFETY PRECAUTIONS

- **This kit is for in vitro diagnostic use only.** Operator should follow the manual closely in order to ensure reliable data. The manual is valid for the present kit only, within the listed composition. Any substitution of kit components is not allowed by CE regulations.
- Do not use kit or its components after the expiration date indicated on the label. Take into account stability period for reconstituted reagents.
- Do not mix or use together reagents from different lots of the kit except substrate, stop solution and wash solution.
- Do not use substrate, stop solution and wash solution supplied by other vendors.
- Use only “P”-labeled Astra Biotech wash solution.
- Note that stop solution is 1 N HCl solution. Avoid contacts with skin and mucosa. In case of contact rinse affected area thoroughly with plenty of water and seek medical advice.
- Take into account the following common procedural notes:
  - always pipette reagents into wells immediately after washing procedure;
  - avoid contamination of the solutions;
  - in case of partial use of the kit, dispense only required volume of the reagent into the tray;
  - do not pour unused reagents back into the original vials;
  - avoid exposure to direct sunlight during incubations;
  - always pipette reagents in the same order to minimize reaction time differences between wells; the total dispensing time for the calibrators, control and samples must not exceed 15 min;
  - the incubation temperature for all the immunological reactions must be kept at +37 °C;
  - do not touch the bottom of the wells;
  - calibrators should be measured in each separate assay. It is also recommended to measure each time T<sub>4</sub> concentration in the control;

- remove the adhesive foil carefully to avoid contamination and don't use the adhesive foil repeatedly.
- 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**, **ANSA-T4**, **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 No 1272/2008.

## 13 MANUAL TEST (REF 24-05)

### 13.1 Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T <sub>4</sub> monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing T <sub>4</sub> conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>ANSA-T4</b>	<b>ANSA-T<sub>4</sub> solution:</b> buffered solution of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>T<sub>4</sub> calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known T <sub>4</sub> concentrations – 0; 15; 30; 60; 150; 400 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). The concentrations of calibrators may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific T <sub>4</sub> concentrations see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	<b>6 vials,</b> 0.5 mL each; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>T<sub>4</sub> control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known T <sub>4</sub> concentration. The range of T <sub>4</sub> concentration may be different for Assay Protocol 1 and 2. For lot specific ranges of T <sub>4</sub> concentration see values for respective Assay Protocol provided in the Quality Control Sheet.	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	2x14 mL, concentrated
<b>STOP</b>	<b>Stop solution:</b> 1 N HCl solution	14 mL, ready to use
	<b>Adhesive foil</b>	2x1 foil (optional)

## 13.2. Equipment and Materials Required but not provided

- 1-channel calibrated variable precision pipettes, with disposable tips;
- 8-channel calibrated variable precision pipette, with disposable tips;
- microplate incubator (+37 °C) or microplate incubator-shaker (+37 °C, shaking speed 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 **Thyroxin kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for the quantitative assay of 40 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in duplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

### 13.3.1 Assay Procedure

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

#### Assay Protocol 1

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

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

- A. Pipette **100  $\mu$ L ANSA-T<sub>4</sub> solution** **ANSA-T4** 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. Pipette **100  $\mu$ L conjugate** **CONJ** into each well, **except wells A1-A2**.

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

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



- D. Incubate strips for **60 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C**.
- E. Wash 4 times, as described below.
- F. Pipette **100 µL substrate** **SUB** into each well (including blank); incubate **at room temperature (+18...+25 °C) in the dark for 15-30 minutes** (depending on the colour intensity) or **10 minutes while shaking (500–800 rpm) at +37 °C**.
- G. 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 (+18...+25 °C)**.
- H. 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 µL of wash solution (section 8) into each well, shake the plate carefully for 5–10 sec and remove the contents of the wells; repeat 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<sub>450 nm</sub>)

The data should meet the following criteria:

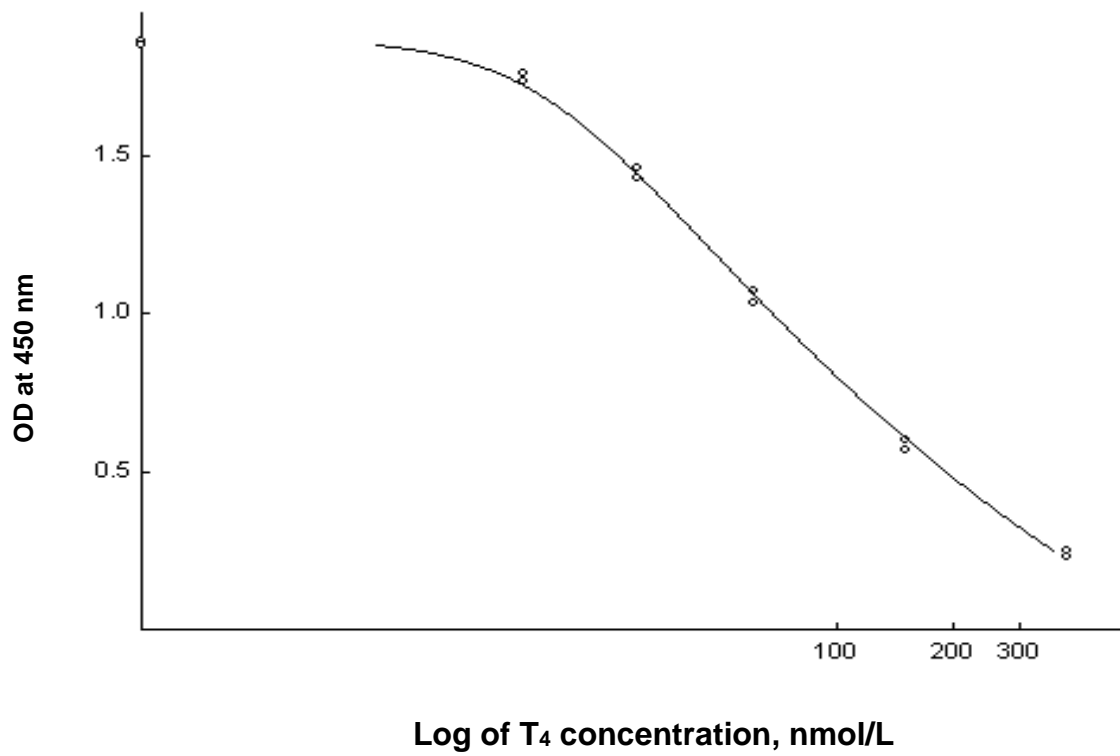
- average blank OD (in wells A1-A2)  $\leq 0.100$ ;
- average OD of Cal 0  $\geq 1.0$  (after blank subtraction);
- control's concentration must fall within the acceptability range that is shown in the Quality Control Sheet.

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

### 13.4.2 Quantitative Determination

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

Any extrapolation of the standard curve to T<sub>4</sub> concentration above the nominal value of the calibrator 5 (approximately 400 nmol/L) is forbidden.



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

### 13.5 Assay scheme to Assay Protocol 1

Reagents	Wells	«Blank»	<b>CAL</b>	Samples
			<b>CONTROL</b>	
<b>ANSA-T4</b>		–	100 µL	100 µL
<b>CAL</b>		–	20 µL	–
<b>CONTROL</b>		–	–	–
Samples		–	–	20 µL
<b>CONJ</b>		–	100 µL	100 µL
Incubation No.1	60 min, +37 °C, 500–800 rpm			
<b>WASH P</b> (diluted)	4 x 300 µL			
<b>SUB</b>	100 µL	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			
<b>STOP</b>	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Stirring	1–2 min, +18...+25 °C			
OD measuring	450 nm			
Calculations	Corresponding software			

## 14 AUTOMATIC TEST (REF 24-05 A)

### 14.1. Material Provided

<b>MP</b>	<b>Microplate:</b> 12 breakable 8-well strips (total 96 wells) coated with anti-T <sub>4</sub> monoclonal antibodies	1 pcs
<b>CONJ</b>	<b>Conjugate:</b> solution containing T <sub>4</sub> conjugated with HRP	14 mL, ready to use
<b>ANSA-T4</b>	<b>ANSA-T<sub>4</sub> solution:</b> buffered solution of 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt	14 mL, ready to use
<b>0-5 CAL</b>	<b>T<sub>4</sub> calibrators:</b> protein-based solutions or lyophilized preparations containing known T <sub>4</sub> concentrations – 0; 15; 30; 60; 150; 400 nmol/L (approximate values - do not use for evaluation of real assay data). For lot specific T <sub>4</sub> concentrations see values provided in the Quality Control Sheet	<b>8 vials,</b> 0.5 mL each: <b>CAL</b> 2,3 2×0.5mL; <b>CAL</b> 0,1,4,5 – 1× 0.5 mL; ready to use or lyophilized
<b>CONTROL</b>	<b>T<sub>4</sub> control:</b> protein-based solution or lyophilized preparation containing known T <sub>4</sub> concentration. For lot specific ranges of T <sub>4</sub> concentration see Quality Control Sheet	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 N 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** 2, 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 **Thyroxin kit** is designed for 96 tests. This is sufficient for 88 unknowns, 6 calibrators, 1 control and 1 blank (OD of TMB solution) in monoplicates, provided that all the strips are used simultaneously.

#### 14.3.1 Reagent Preparation

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

**Note:** *Preparation of other reagents see in section 8.*

**TRIAL** Working solution of Trial for washing internal hydraulic lines and needles of automatic analyser “Alisei”  
Prepare required volume of **Trial solution** by dilution of the concentrate 5000-fold with distilled or deionized water before analysis:

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

Mix thoroughly, avoid foaming.

#### 14.3.2 Assay Procedure for Automatic Test

---

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

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 thyroxin concentration is hardwired in analyser memory.

## **14.4 Data Processing**

### **14.4.1 Data Reliability (OD 450 nm)**

See criteria in section 13.4.1.

## **14.5 Safety precautions**

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

August 26, 2019



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