



BIOCLONE

ELEGANCE

# KIT ELISA IGFBP-2

REF 40 BP296

Σ 96

ITALIANO



## GARANZIA

Il fabbricante garantisce per il suo prodotto esclusivamente la sua capacità di misurare l'analita specificato, quando usato conformemente alle istruzioni scritte fornite dal fabbricante stesso. L'uso del kit diagnostico per qualunque altro scopo esula dall'impiego previsto per il prodotto ed avviene a rischio esclusivo dell'utilizzatore. Il fabbricante declina ogni tipo di garanzia implicita di commerciabilità, convenienza d'uso o utilità presunta a qualsiasi altro titolo. Qualsiasi indennizzo dovuto a un mancato funzionamento o errore del kit diagnostico usato conformemente alle istruzioni si limita al valore di sostituzione del kit. La sola responsabilità di Bioclone Australia Pty Limited e dei propri distributori si limita alla sostituzione del prodotto oppure al rimborso della spesa d'acquisto. Bioclone Australia Pty Limited non è responsabile per danni materiali, lesioni personali o perdite di natura economica causati dai suoi prodotti.

Prodotto da Bioclone Australia Pty Limited

(società affiliata a Hitachi Chemical Co., Ltd) ABN 14 002 036 071  
71-73 Railway Parade Marrickville NSW AUSTRALIA 2204

Tel +61 (0) 2 9517 1966 Fax +61 (0) 2 9517 2990 Numero verde 1800 251 138  
Email sales@bioclone.com.au Web www.bioclone.com.au



Hitachi Chemical Diagnostics Inc.

Hitachi Europe Limited, Whitebrook Park, Lower Cookham Road  
Maidenhead, Berkshire, SL6 8YA, UK. Phone: +44 1628 585 591

## FINALITA' D'USO

Il kit ELISA ELEGANCE IGFBP-2 è stato sviluppato per il dosaggio quantitativo *in vitro* a fini diagnostici della Proteina2 legante il Fattore di Crescita Insulino-Simile (IGFBP-2) nel siero.

## PRINCIPIO OPERATIVO DEL KIT ELISA ELEGANCE

L'ELISA è un metodo immunoenzimatico competitivo che vede l'impiego associato di un anticorpo anti-IGFBP-2 policlonale di coniglio (reattivo anticorpo) e di IGFBP-2 biotinilato (reattivo coniugato). Un anticorpo policlonale anti-coniglio è legato ai micropozzetti della micropiastrea e funge da anticorpo di cattura. I sieri in esame, prediluiti 1:25 con il Calibratore A, contengono una quantità incognita di IGFBP-2 che compete con la IGFBP-2 biotinilata per legarsi all'anticorpo adeso ai micropozzetti. Dopo incubazione notturna, i micropozzetti della micropiastrea vengono lavati per rimuovere ogni componente non legata. Viene aggiunto un complesso streptavidina-perossidasi (Reattivo di Amplificazione) che si lega in più copie su ogni molecola di anticorpo biotinilato. Dopo un ulteriore lavaggio, si aggiunge soluzione di substrato che reagisce con ciascuna molecola di perossidasi legata, determinando una produzione di colore che risulta direttamente proporzionale alla quantità di antigene originariamente presente nel campione, e che può essere calcolata mediante una curva di calibrazione.

## REAGENTI FORNITI NEL KIT ELEGANCE, STABILITA' E CONSERVAZIONE

Numero di test - 96. Il kit e tutti i suoi componenti, nuovi o già avviati, devono essere conservati ad una temperatura compresa tra i 2-8°C sino alla data di scadenza riportata sulla confezione.

### IGFBP-2:

**Micropozzetti sensibilizzati**  
**96 micropozzetti REF # BP2A96**  
Cornice con strisce di micropozzetti sensibilizzati con anticorpo anti-IGFBP-2.  
Pronto all'uso.

### IGFBP-2:

**Reattivo Anticorpo**  
**1 fialone REF # BP2B96**  
2.5 mL di anticorpo IGFBP-2 in una soluzione tampone contenente albumina bovina e un colorante blu. Contiene Bronidox L, 0.2% v/v e tiomersale, 0.02% w/v.  
Pronto all'uso.

### IGFBP-2:

**Reattivo di Amplificazione**  
**1 fialone REF # BP2P96**  
10 mL di Streptavidina-perossidasi (Streptavidina estratta da *S. avidinii*) in una soluzione tampone contenente albumina bovina e un colorante violetto. Contiene Bronidox L, 0.2% v/v e tiomersale, 0.02% w/v.  
Pronto all'uso.

### Soluzione di lavaggio concentrata

**1 fialone REF # EWC96**  
50 mL di soluzione concentrata 15 volte. Contiene tiomersale, 0.09% w/v. Diluire prima dell'uso.

## IGFBP-2:

### Reattivo Coniugato

**1 fialone REF # BP2C96**  
2.5 mL di anticorpo anti-IGFBP-2 biotinilato in una soluzione tampone contenente albumina bovina e un colorante rosso. Contiene Bronidox L, 0.2% v/v e tiomersale, 0.02% w/v.  
Pronto all'uso.

### Soluzione substrato TMB N

**1 fialone REF # TMBB96**  
10 mL di 3,3',5,5'-terametilbenzidina (TMB) e perossido d'idrogeno in una soluzione stabilizzante.  
Pronto all'uso.

## IGFBP-2:

### Calibratori/ Controlli

**1 fialone REF # EBP2S1**  
**5 fialoni REF # EBP2S2-6**  
**1 fialone REF # EPB2C1**  
20 mL di Calibratore A e 0.5 mL di Calibratori B-F e di Controllo 1 ciascuno, in tampone fosfati con albumina bovina all'1%. Contiene tiomersale, 0.01% p/v e Bronidox L, 0.2% p/v.  
Liofilizzati.

## PRECAUZIONI ED AVVERTENZE PER L'USO

Manipolazione, impiego, conservazione e smaltimento dei campioni e dei componenti del kit devono avvenire in accordo con le linee guida e i regolamenti di sicurezza nazionali o locali.

### Campioni e Calibratori

I componenti costitutivi dei calibratori sono stati testati con metodi approvati ed accreditati al fine di stabilire la presenza di antigeni di superficie per l'epatite B, anticorpi per l'epatite C ed anticorpi contro HIV - 1/2 (AIDS) e sono risultati non reattivi a tutte le indagini sopra elencate. Si raccomanda tuttavia di manipolare tutti i campioni con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi.

### CONSERVANTI

Il kit contiene tiomersale e Bronidox L come conservanti. La presenza di tali conservanti nei reattivi rende gli stessi potenzialmente tossici è pertanto consigliabile maneggiare i vari componenti del kit con attenzione, evitando l'ingestione o il contatto con la cute.

### Substrato

Evitare qualsiasi contatto con la cute.

## RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

Non è richiesta una preparazione particolare dei pazienti. Si possono utilizzare campioni sia di siero, raccolti in modo appropriato per le analisi di laboratorio.

E' preferibile evitare campioni fortemente emolizzati, lipemici e con un elevato grado di torbidità. I campioni possono essere mantenuti a 2-8°C se processati entro 48 ore. Per una conservazione più prolungata è consigliabile congelare i campioni a -20°C, evitando congelamenti e scongelamenti ripetuti.

Dopo scongelati, verificare l'assenza di flocculazioni, e mescolare per inversione immediatamente prima dell'analisi. Campioni torbidi o flocculati vanno centrifugati prima dell'uso.

## MATERIALE RICHIESTO NON COMPRESO NEL KIT

- \* Acqua distillata o deionizzata
- \* 2M HCl
- \* Pipette di precisione
- \* Pipette a ripetizione
- \* Cilindro graduato da 1 litro
- \* Carta assorbente
- \* Contaminuti
- \* Agitatore vortex
- \* Lettore di micropiastre
- \* Agitatore per micropiastre
- \* Sistema di lavaggio per micropiastre

## NOTE PROCEDURALI

Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente (20-25°C) e miscelarli delicatamente per inversione prima dell'uso.

L'eventuale contaminazione dei reattivi potrebbe determinare una riduzione delle performance del metodo.

Si raccomanda di operare in duplicato. La curva di calibrazione deve essere ripetuta ad ogni determinazione. I campioni con concentrazioni superiori al valore del calibratore più alto devono essere diluiti prima dell'analisi con il calibratore zero.

I vari passaggi della metodica devono essere eseguiti in successione evitando interruzioni. Se non è possibile procedere all'aggiunta di reagente di amplificazione o della soluzione substrato subito dopo i lavaggi, i micropozzetti possono essere lasciati capovolti a scolare sulla carta assorbente per un massimo di 15 minuti.

E' consigliabile non mescolare reattivi provenienti da lotti diversi. Il fotometro e le pipette devono essere opportunamente tarate prima dell'utilizzo.

### Lavaggio

L'efficienza della fase di lavaggio è cruciale per garantire la precisione del metodo. E' consigliabile usare un sistema automatico di lavaggio dei micropozzetti. Evitare la trascinazione di liquido di lavaggio da un micropozzetto all'altro.

### Controllo di qualità

In ogni sessione analitica vanno inseriti campioni di controllo che devono risultare entro le specifiche fissate dal laboratorio per poter validare l'analisi.

## PROCEDURA OPERATIVA

### Preparazione dei Reattivi

**Soluzione di lavaggio**  
Diluire 1 a 15 la soluzione di lavaggio concentrata con acqua deionizzata. La soluzione di lavaggio può essere conservata a temperatura ambiente (20-25°C) per 12 settimane.

### Calibratori e controlli

Per ricostituire i calibratori ed i controlli liofilizzati aggiungere il volume di acqua deionizzata indicato sull'etichetta di ciascun fialone.

Lasciar riposare fino al completo scioglimento del liofilo (almeno 30 minuti) e quindi miscelare delicatamente per inversione. Le esatte concentrazioni dei calibratori, determinate lotto per lotto, sono riportate su un foglio a parte all'interno del kit. Dopo la ricostituzione, i calibratori possono essere conservati fino a 4 settimane congelandoli a -20°C.

#### Procedura di diluizione

##### Calibratore A

##### Concentrazione di 0 ng/mL

Diluire il Calibratore A, 1 a 4 con acqua deionizzata. Se il Calibratore A è cristallizzato è necessario scaldarlo a 37°C. La soluzione del Calibratore A è usata anche come diluente dei campioni e può essere conservata a 2-8°C sino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

##### Preparazione dei campioni

I campioni dei pazienti (ma non i calibratori o i controlli) devono essere diluiti 1:25.

1. Contrassegnare le provette per le diluizioni (1 per campione).
2. Pipettare 10 µL di campione, aggiungere 250 µL di calibratore A come diluente. Miscelare con vortex.

##### Protocollo

1. Prelevare dalla confezione solo i micropozzetti necessari in base al numero di test richiesti. Richiudere la confezione, garantendone la corretta conservazione.
2. Pipettare 50 µL di campione (calibratore, controllo) in doppio nei micropozzetti appropriati. Dispensare i campioni in un tempo non superiore ai 20 minuti.
3. Pipettare 25 µL di Coniugato IGFBP-2 (rosso) in tutti i micropozzetti.
4. Pipettare 25 µL di Anticorpo IGFBP-2 (blu) in tutti i micropozzetti.
5. Coprire i micropozzetti ed incubare per tutta la notte (16-24 ore), a temperatura ambiente (20-25°C) senza agitare.
6. Dopo l'incubazione, lavare i micropozzetti. Aspirare il liquido e risciacquare ciascun micropozzetto per quattro volte con 250 µL di soluzione di lavaggio. Dopo il lavaggio finale, capovolgere i micropozzetti ed asciugarli appoggiandoli sulla carta assorbente al fine di scolare la soluzione di lavaggio. Verificare che non ci siano bolle d'aria nei micropozzetti.
7. Pipettare 100 µL di Reagente di Amplificazione IGFBP-2 (violetto) in tutti i micropozzetti.
8. Coprire i micropozzetti con l'apposito copripozzetti ed incubare per 10 minuti, su agitatore per micropiastre ed a temperatura ambiente (20-25°C).
9. Dopo l'incubazione ripetere la fase di lavaggio.
10. Pipettare 100 µL di Soluzione Substrato in ciascun micropozzetto. Il tempo di inizio dell'incubazione viene calcolato a partire dall'aggiunta della soluzione di substrato al primo micropozzetto.

11. Coprire i micropozzetti con l'apposito copripozzetti ed incubare per 5 minuti, su agitatore per micropiastre ed a temperatura ambiente (20-25°C).

12. Pipettare 50 µL di 2M HCl in tutti i micropozzetti nella stessa sequenza e con gli stessi tempi dell'aggiunta della soluzione substrato.

13. Effettuare una lettura end point a 450 nm ed analizzare i dati seguendo le modalità riportate sul manuale operativo del lettore dimicropiastre. La fase di lettura deve essere effettuata entro 30 minuti dall'arresto della reazione.

#### CALCOLO DEI RISULTATI

Il calcolo dei risultati può essere effettuato manualmente se non si dispone di un lettore che li elabori automaticamente. Determinare la Densità ottica (DO) per ogni micropozzetto. Tracciare la curva di calibrazione su carta doppia logaritmica riportando la concentrazione dei calibratori sull'asse x e la DO sull'asse delle y. La curva può essere ottenuta collegando i punti con segmenti di retta oppure mediante una routine di interpolazione curvilinea, per esempio mediante funzioni di spline cubiche. Sulla curva di calibrazione identificare la DO dei campioni e risalire alla concentrazione, che verrà espressa in ng/mL di IGFBP-2.

I calibratori sono costituiti per permettere una diluizione del campione di 1:25.

#### Il range del kit ELEGANCE

ELISA IGFBP-2 è compreso tra 0 e 3000 ng/mL, ma la concentrazione massima effettivamente determinabile può venir limitata dalle caratteristiche di linearità del fotometro usato. Se il valore di DO del calibratore più alto è al di sopra del range di linearità del fotometro, questo calibratore va omesso dal grafico della curva del calibratore.

#### MODEL CALCULATIONS

##### Endpoint Data

ID	Ave OD	IGBP-2 (ng/mL)
0	2.171	
82.7	1.786	
262	1.287	
529	0.839	
1226	0.531	
2766	0.321	
Control 1	0.779	642.0

#### CALIBRAZIONE

I calibratori forniti con questo kit sono espressi in ng/mL e calcolati per riferimento a materiale di calibrazione primario, mediante analisi quantitativa del contenuto in aminoacidi.

Per convertire i risultati in unità di misura tradizionali (nmol/L) usare la seguente equazione:

$$\text{nmol/L} = \frac{\text{ng/mL}}{0.0321}$$

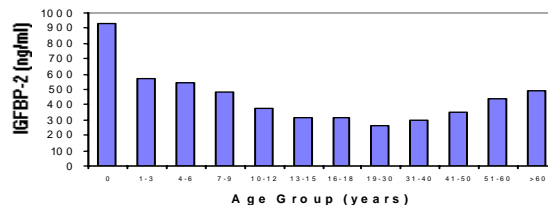
#### LIMITAZIONI

Campioni di siero che presentano evidente emolisi, elevato grado di lipemia e torbidità possono portare a risultati alterati.

#### VALORI ATTESI

Si raccomanda che ciascun laboratorio stabilisca i propri valori di riferimento su un campione rappresentativo della popolazione. Il range di riferimento che segue è stato ottenuto dall'analisi di campioni di siero provenienti da individui in buona salute e va preso solo come guida:

Combined (M & F) Normal Range (IGFBP-2) (n=537)



#### CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

##### Precisione entro la serie

Campione	n	Media ± 2SD (ng/mL)	%CV
1	19	156 ± 32	10.2
2	19	585 ± 65	5.5
3	19	1567 ± 221	7.1

##### Precisione fra le serie

Campione	n*	Media ± 2SD (ng/mL)	%CV
1	18	113 ± 22	9.7
2	18	684 ± 118	8.6
3	18	1313 ± 182	6.9

\* in doppio

##### Specificità

Analiti	Concentrazione misurata	Reattività crociata con
IGFBP-1	130 µg/mL	non rilevabile
IGFBP-3	130 µg/mL	non rilevabile
IGFBP-4	130 µg/mL	non rilevabile
IGFBP-5	130 µg/mL	non rilevabile
IGFBP-6	130 µg/mL	non rilevabile
IGF-1	130 µg/mL	non rilevabile
IGF-II	130 µg/mL	non rilevabile
GH	11 µg/mL	non rilevabile

##### Accuratezza

Il recupero è stato calcolato mediante dosaggi prima e dopo l'aggiunta di analita esogeno.

Campione	IGFBP-2 (ng/mL) Osservato	IGFBP-2 (ng/mL) Atteso	%CV
1	125	121	103.0
2	270	282	96.3
3	934	910	103.0
4	1457	1520	95.7

##### Diluizioni

Un campione è stato diluito con calibratore zero, analizzato e se ne è calcolato il recupero.

Campione	IGFBP-2 (ng/mL) Osservato	IGFBP-2 (ng/mL) Atteso	%recupero
Neat	1866		
1/2	1039	933	111.4
1/4	467	467	100.0
1/8	221	233	94.9

##### SENSIBILITÀ

La sensibilità del metodo è inferiore a 10 ng/mL. In base all'attuale concentrazione di IGFBP-2, la sensibilità è 0.4 ng/mL.

La sensibilità è definita come quella concentrazione di analita che corrisponde a un segnale strumentale (DO) il quale disti due deviazioni standard dalla media della DO ottenuta misurando in tre diverse serie 8 replicati del calibratore zero.

##### Interferenze

Non è stata osservata alcuna interferenza con il recupero analitico per concentrazioni di emoglobina fino a 250 mg/dL, bilirubina fino a 10 mg/dL, trigliceridi fino a 970 mg/dL.

#### INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Il kit ELEGANCE ELISA IGFBP-2 è prodotto da :

Bioclone Australia Pty Limited  
71-73 Railway Parade, Marrickville  
NSW 2204, AUSTRALIA  
Telefono +61 (0) 2 9517 1966 numero verde 1800 251 138  
Fax +61 (0) 2 9517 2990  
Email sales@bioclone.com.au Web www.bioclone.com.au

#### ASSISTENZA TECNICA

Bioclone fornisce un completo servizio di assistenza tecnica al numero +61 (0) 2 9517 1966 o il numero libero 1800 251 138.