



# ELEGANCE KIT ELISA

## IRT NEONATALE

REF 40 500480

REF 40 502400

Σ 480

Σ 2400

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](mailto:sales@bioclone.com.au) Web [www.bioclone.com.au](http://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

### FINALITÀ D'USO

Il kit *ELEGANCE* ELISA IRT Neonatale è stato creato per la determinazione diagnostica quantitativa *in vitro* del tripsinogeno immunoreattivo (IRT) su gocce di sangue umano neonatale (spot test).

### PRINCIPIO OPERATIVO DELL'ELEGANCE ELISA IRT NEONATALE

L'*ELEGANCE* ELISA è un test immunoenzimatico. L'IRT (Tripsinogeno Immuno Reattivo) è eluito dallo spot test e si lega sia al primo anticorpo unito alle pareti del micropozzetto sia al secondo anticorpo biotinilato reattivo (tecnica sandwich). Si effettua un lavaggio dei micropozzetti per eliminare i componenti non legati. Si aggiunge la Streptavidina-perossidasi (Reagente di Amplificazione) che forma legami multipli con l'anticorpo biotinilato. Dopo il lavaggio, la Soluzione Substrato reagisce con la perossidasi coniugata producendo una quantità di colore direttamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione. La quantità di antigene può essere calcolata dalla curva di calibrazione.

### ELEGANCE: REAGENTI FORNITI, STABILITÀ E CONSERVAZIONE

Composizione delle confezioni - 480 test e 2400 test (tra parentesi). Il kit e tutti i suoi componenti, nuovi o già avviati, vanno conservati a una temperatura compresa tra i 2 e gli 8°C fino alla data di scadenza indicata.

### IRT Neonatale:

#### Micropozzetti rivestiti

1 x 96 micropozzetti  
Cod # ITA96

5 x 96 micropozzetti  
Cod # ITA5

(25 x 96 micropozzetti  
Cod # ITA25)

Confezione contenente micropozzetti rivestiti di anticorpo anti-IRT. Pronta per l'uso.

### IRT Neonatale:

#### Anticorpo Reattivo

1 flacone Cod # ITB480  
(1 flacone Cod # ITB25)  
50 (250) ml di anticorpo anti-IRT biotinilato in una soluzione tampone contenente sieralbumina bovina e un colorante blu. Contiene azide sodica, 0.1% p/v. Pronta per l'uso.

### IRT Neonatale:

#### Reagente di Amplificazione

1 flacone Cod # ITP480  
(1 flacone Cod # ITP25)  
50 (250) ml di streptavidina-perossidasi (streptavidina estratta da *S. avidinii*) in una soluzione tampone contenente sieralbumina bovina e un colorante violetto. Contiene Bronidox L, 0.2% v/v, e tiomersale, 0.02% p/v. Pronta per l'uso.

### Soluzione di Lavaggio Concentrata

1 flacone Cod # EWC5  
(2 flaconi Cod # EWC25)  
250 (500) ml di soluzione di lavaggio concentrata 15 volte. Contiene tiomersale, 0.15% p/v. Diluire prima dell'uso.

### Soluzione Stabilizzante di Stop

1 flacone Cod # ESCL5  
(1 flacone Cod # ESCL25)  
30 (124) ml 2M HCl  
Pronta per l'uso.

### Soluzione Substrato TMB N

1 flacone Cod # TMBB5  
(1 flacone Cod # TMBB25)  
50 (250) ml 3,3', 5,5' di tetrametilbenzidina e perossido di idrogeno in soluzione stabilizzante. Pronta per l'uso.

### IRT Neonatale: Calibratori

Disponibile come:

6 flaconi Cod # EITS7  
(2 x 6 flaconi Cod # EITS7)  
0.5 ml ciascuno in una soluzione tampone contenente BSA e un colorante giallo. Contiene azide sodica 0.2% p/v, e tiomersale, 0.01% p/v. Liofilizzati.

Oppure:

### IRT Neonatale:

#### Calibratori e Controlli degli Spot di sangue

1 set Cod # ETNS6  
(4 set Cod # ETNS7)

Spot secchi di TSH umano con 6 calibratori (A-F) e 2 controlli (1-2) su carta filtrante. Pronti per l'uso. (Un ulteriore Calibratore Superiore [da 1000 ug/L nominali] e Controllo sono disponibili su richiesta)

### PRECAUZIONI E AVVERTENZE PER GLI UTILIZZATORI

Il trattamento dei campioni e dei componenti del kit, il loro uso, conservazione ed eliminazione, devono essere effettuati secondo le norme e procedure di sicurezza locali o nazionali.

### Campioni e Calibratori

Il materiale originale dei calibratori è stato testato con metodi approvati e accreditati al fine di verificare l'eventuale presenza di antigeni di superficie per l'epatite B, anticorpi per l'epatite C ed anticorpi contro HIV - 1 (AIDS): è risultato non reattivo per nessuno di essi. Tuttavia, si raccomanda di maneggiare tutti i campioni come se potessero trasmettere malattie infettive.

### Conservanti

Il kit contiene i seguenti conservanti: azide sodica, tiomersale e Bronidox L. Siccome i reagenti contengono conservanti potenzialmente tossici, bisogna maneggiandoli prestare attenzione ad evitare ingestione o contatto con la cute. L'azide sodica può reagire con le tubature in piombo o rame formando azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Soluzione Substrato e Soluzione Stabilizzante di Stop Evitare qualsiasi contatto con la cute.

### RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

L'*ELEGANCE* ELISA IRT Neonatale è stato creato per essere utilizzato con campioni di sangue neonatale raccolti mediante prelievo capillare da puntura del tallone ed essiccati su carta filtrante secondo le istruzioni NCCLS LA4A, dove applicabili. La carta filtrante deve essere Schleicher and Schuell Grade 903 in modo che i campioni siano equivalenti ai calibratori forniti.

Il sangue per un prick test neonatale del tallone si raccoglie 3-5 giorni dopo la nascita. Con un'applicazione della carta filtrante su una goccia di sangue fuoriuscente dal tallone punto del

bimbo si ottiene uno spot di sangue che ricopre un'area circolare campione sulla carta filtrante. L'area campione su carta filtrante deve essere interamente ricoperta e completamente impregnata di sangue. Dopo aver raccolto i campioni per il test, bisogna lasciare asciugare le carte filtranti orizzontalmente (2 ore o più). Gli specimen asciutti possono essere conservati a 2-8°C. Si devono analizzare solo gli spot di sangue preparati nel modo suddetto. Le carte filtranti inutilizzate devono essere asciugate a temperatura ambiente (20-25°C).

### MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI MA NON FORNITI

- \* Acqua distillata o deionizzata
- \* Tagliatrice meccanica di dischi (3mm)
- \* Pinze
- \* Pipette di precisione
- \* Pipette a ripetizione
- \* Cilindro graduato da 11
- \* Tessuto assorbente (privo di filaccia)
- \* Timer
- \* Agitatore per micropiastre
- \* Sistema di lavaggio automatico per micropiastre
- \* Sistema di lettura per micropiastre.

### NOTE PROCEDURALI

Portare tutti i reattivi e i campioni a temperatura ambiente (20-25°C) e mescolarli delicatamente per inversione prima dell'uso. La contaminazione dei reagenti porta a prestazioni di qualità scadente. Si raccomanda di operare in duplicato.

La curva di calibrazione deve essere realizzata per ogni test. Prima del primo lavaggio, si devono rimuovere i dischi mediante suzione o pungendoli delicatamente con uno spillo. Tutti i passaggi della metodica devono essere eseguiti in successione evitando interruzioni. E' possibile interrompere l'esecuzione solo se ai micropozzetti non è stato ancora aggiunto il Reagente di Amplificazione, o la Soluzione Substrato, allora si possono lasciare le micropiastre capovolte su un tessuto privo di filaccia per un massimo di 30 minuti (Reagente di Amplificazione) e 30 minuti (Soluzione Substrato). I reagenti sono bilanciati in ogni kit, pertanto è consigliabile non mescolare reagenti di lotti diversi. Prima dell'uso bisogna tarare adeguatamente il fotometro e tutte le pipette da utilizzare.

### Lavaggio

L'efficacia dell'operazione di lavaggio è vitale per ottenere una buona precisione. I micropozzetti si lavano utilizzando un lavapiastre automatico. Evitare la trascinazione della soluzione di lavaggio da un micropozzetto all'altro.

### Controllo di qualità

Per assicurare una corretta procedura è bene effettuare un controllo degli specimen in ogni sessione analitica. Per approvare l'analisi, i valori di controllo devono situarsi all'interno dei range fissati dal laboratorio.

## PROCEDURA OPERATIVA

### Preparazione dei Reagenti

#### Soluzione di lavaggio

Diluire 1 a 15 la soluzione concentrata di lavaggio con acqua deionizzata.

La soluzione di lavaggio può essere conservata a temperatura ambiente (20-25°C) per 12 settimane.

#### Liofilizzati Calibratori\*

Per ricostituire i calibratori liofilici, aggiungere la quantità di acqua deionizzata indicata sull'etichetta di ogni flacone. Lasciar riposare i flaconi fino alla dissoluzione completa del liofilo (almeno 30 minuti), in seguito miscelare delicatamente per inversione. Le concentrazioni esatte 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 a -20°C fino a 8 settimane.

#### Calibratori e Controlli degli Spot di sangue\*

Le concentrazioni esatte dei calibratori, determinate lotto per lotto, sono riportate su un foglio a parte per ogni set di spot di sangue. Per evitare la condensazione, non aprire gli spot di sangue prima del riequilibrio della temperatura. Richiudere ermeticamente nella borsa di plastica le strisce impregnate e conservarle a 2-8°C.

#### Protocollo

1. Disporre sulla piastra solo il numero di micropozzetti necessari, in base al numero di test da effettuare. Rimettere nella loro borsa i micropozzetti inutilizzati e riporla a 2-8°C.

2. Deporre dischetti di 3 mm di campione o di controllo nei micropozzetti appropriati. Nel tagliare i dischetti del campione, tenersi al centro della macchia evitando i bordi.

3. Pipettare 15 µl o un singolo dischetto perforato da 3 millimetri o ciascun calibratore (come da dotazione) nei micropozzetti appropriati. Il tempo impiegato per distribuire eventuali calibratori liquidi non deve superare i 20 minuti.

4. Pipettare 100 µl di Anticorpo Reagente IRT neonatale (blu) in tutti i micropozzetti.

5. Coprire i micropozzetti con il coperchio e incubare per 10 minuti in un agitatore per micropiastre a temperatura ambiente (20-25°C).

6. Incubare i micropozzetti per una notte (16-24 ore) senza agitazione a temperatura ambiente (20-25°C).

7. Il giorno seguente incubare per 10 minuti in un agitatore per micropiastre a temperatura ambiente (20-25°C).

8. Dopo l'incubazione, rimuovere i dischetti.

9. Lavare i micropozzetti: aspirare il liquido e sciacquare ogni pozzetto 4 volte con 250 µl di soluzione di lavaggio. Dopo il lavaggio finale, capovolgere i micropozzetti su carta assorbente e battere con fermezza per eliminare qualsiasi resto della soluzione di lavaggio. Assicurarsi che non

restino bolle d'aria nei micropozzetti.

10. Pipettare 100 µl di Reagente IRT Neonatale di Amplificazione (violetto) in ogni micropozzetto.

11. Coprire i micropozzetti con il coperchio e incubare per 10 minuti in un agitatore per micropiastre a temperatura ambiente (20-25°C).

12. Dopo l'incubazione, ripetere la fase di lavaggio.

13. Pipettare 100 µl di Soluzione Substrato in tutti i micropozzetti. Il tempo di incubazione si calcola a partire dall'aggiunta della Soluzione Substrato al primo micropozzetto.

14. Coprire i micropozzetti con il coperchio e incubare per 10 minuti, senza agitazione, a temperatura ambiente (20-25°C).

15. Pipettare 50 µl di Soluzione Stabilizzante di Stop in tutti i micropozzetti, rispettando lo stesso ordine e le medesime sequenze temporali impiegati nell'aggiunta della Soluzione Substrato.

16. Realizzare una lettura in end-point a 450 nm ed elaborare i dati come descritto nel manuale d'uso del lettore di micropiastre. Questa fase di lettura deve essere effettuata entro 30 minuti dal termine della reazione.

#### CALCOLO DEI RISULTATI

Il calcolo dei risultati può essere effettuato manualmente se non si dispone di programmi di interpolazione automatica.

Determinare la densità ottica (DO) per ogni micropozzetto. Tracciare la curva di calibrazione utilizzando carta bilogarithmica per grafici, riportando la concentrazione dei calibratori sull'asse X e la DO sull'asse Y. La curva può essere tracciata punto per punto o usando una routine di interpolazione di curve, basata, per esempio, sulle funzioni di spline. Interpolare i valori del campione utilizzando la DO misurata in questa curva di calibrazione. Esprimere il valore per ogni campione in µg/l di IRT su sangue intero.

Il range dell'ELEGANCE IRT Neonatale va da 0 a circa 1000\* µg/l nel sangue intero, ma la concentrazione massima effettivamente misurabile è limitata dalle caratteristiche di linearità ottica del fotometro utilizzato.

Se il valore di DO del calibratore più alto è superiore al range del fotometro, allora si deve omettere questo calibratore dal diagramma della curva di calibrazione.

Parimenti, qualsiasi campione con valore superiore al range del lettore di micropiastre deve essere annotato semplicemente come maggiore del più alto calibratore accettabile.

#### ESEMPIO DI CALCOLI

ID	DO media	IRT (µg/l W.B)
0	0.054	
13.2	0.507	
30.8	1.169	
67.8	2.011	
161	2.629	
331	3.052	
1041*	3.513	
Campione 1	1.630	46.8
Campione 2	2.315	103.8
Campione 3	2.930	271.8

#### CALIBRAZIONE

I calibratori forniti in questo kit sono calibrati basandosi sulla misura delle proteine e sono espressi in µg/l di sangue intero. Si considera che il volume di sangue su un dischetto di 3 mm è di 3 µl con un valore di ematocrito del 55% (v/v). Si può fare una conversione delle unità standard utilizzando il rapporto seguente:

$$\mu\text{g/l siero} = \mu\text{g/l sangue intero} \times 2.2$$

#### VALORI ATTESI

Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca una propria scala di riferimento basata su un campione di popolazione rappresentativo. Normalmente, per i neonati di 3-5 giorni si usa un valore di cut-off di 50 µg/l su sangue intero. Si considerano normali i campioni con misura inferiore al cut-off positivo presunto. Si è scoperto che nei bambini sani le concentrazioni di tripsinogeno non sono distribuite normalmente, però possono essere convertite ad una distribuzione normale per mezzo di una trasformazione logaritmica.

#### PRESTAZIONI CARATTERISTICHE

##### Precisione entro la serie

Campione	n	Media ± 2SD (µg/l sangue intero)	%CV
1	20	33.1 ± 1.8	2.8
2	20	58.0 ± 5.7	4.9
3	20	14.9 ± 2.4	7.9

##### Precisione fra le serie

Campione	n *	Media ± 2SD (µg/l sangue intero)	%CV
1	66	28.0 ± 2.8	7.0
2	66	56.4 ± 6.2	6.3
3	66	15.8 ± 3.5	3.7

\* in duplicato

##### Specificità

Analita crociata	Concentrazione misurata	IRT apparente (µg/l W.B.)	Reattività
------------------	-------------------------	---------------------------	------------

Umano			
α <sub>2</sub> -Macroglobulina	50 mg/ml	<1*	N.D.
α-1-Antitripsina	3 mg/ml	<1*	N.D.
α-Chimotripsina A	780 ng/ml	<1*	N.D.
Bovino			
Tripsinogeno	500 ng/ml	<1*	N.D.

##### Accuratezza

Il recupero analitico è stato calcolato come differenza fra due dosaggi, prima e dopo l'aggiunta di analita esogeno.

Campione	IRT misurato (µg/l W.B.)	IRT atteso (µg/l W.B.L)	% recupero
1	95.3	94.7	100.6
2	154.0	153.0	100.7
3	259.7	226.0	114.9

##### Diluizione

Un campione è stato diluito nel siero zero, poi testato, indi si è calcolato il recupero.

Campione	IRT osservato (µg/l W.B.L)	IRT atteso (µg/l W.B.L)	% Recupero
Non diluito	196.7		
1/2	98.0	98.4	99.6
1/4	49.7	49.2	101.0
1/8	24.5	24.6	99.6

##### Effetto gancio ad alte dosi

Per le caratteristiche del test, che rendono possibile la presenza dell'effetto "gancio" (hook) alle dosi più alte, si possono verificare risultati aberranti. L'effetto Hook non è stato trovato nelle prove di campioni con valori di IRT superiori o uguali al limite del test di 80000 µg/l su sangue intero.

##### Sensibilità

La sensibilità del test normalmente è inferiore a 1 µg/l su sangue intero (2.2 µg/l su siero). Si definisce "sensibilità" la 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 20 replicati del calibratore zero.

#### INFORMAZIONI PER LE ORDINAZIONI

L'ELEGANCE NEONATAL IRT ELISA 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

L'assistenza tecnica è disponibile chiamando Bioclone al +61 (0) 2 9517 1966 o al Numero Verde 1800 251 138

PART No.: EKBIRTI Ed. 6 - Data di revisione: 5 maggio 2008

(\*se applicabile)