



BIOCLONE

# ELEGANCE KIT ELISA FT<sub>4</sub>

REF 40 465096

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](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

## FINALITA' D'USO

Il kit *ELEGANCE* ELISA FT<sub>4</sub> è stato sviluppato per la determinazione quantitativa diagnostica in vitro della Tiroxina libera (FT<sub>4</sub>) presente nel siero e nel plasma.

## PRINCIPIO OPERATIVO DEL KIT ELISA ELEGANCE

L' *ELEGANCE* ELISA è un metodo immunoenzimatico che associa un anticorpo monoclonale anti T<sub>4</sub> (Anticorpo Reattivo) e un anticorpo policlonale anti-IgG murine legato ai micropozzetti di una micropiastrella. E' un metodo in due fasi (a titolazione inversa) che utilizza T<sub>4</sub> coniugato a perossidasi di rafano (T<sub>4</sub>-HRP) per produrre il segnale da misurare.

Durante la prima incubazione l'antigene presente nel campione si lega all'anticorpo reattivo e quest'ultimo all'anticorpo antimurino adeso ai micropozzetti. I micropozzetti vengono lavati al fine di rimuovere i componenti non legati. Si aggiunge T<sub>4</sub>-HRP (Reagente coniugato) il quale si lega alla quota di anticorpo monoclonale non ancora occupata dall'antigene del paziente, saturandolo. Dopo il lavaggio del coniugato in eccesso, si aggiunge soluzione substrato che reagisce con il perossido del coniugato rimasto legato al complesso producendo colore. Il colore risulta inversamente proporzionale alla quantità di antigene del campione; quest'ultimo può essere calcolato dalla curva di calibrazione.

## ELEGANCE REAGENTI FORNITI, STABILITA' E CONSERVAZIONE

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

### FT<sub>4</sub>: Micropozzetti sensibilizzati 96 micropozzetti REF # T4A96

La confezione contiene micropozzetti sensibilizzati con anticorpi anti-IgG murine. Pronti all'uso.

### FT<sub>4</sub>: Anticorpo Reattivo 1 flacone REF # T4B96

10 mL di anticorpo murino anti-T<sub>4</sub> in una soluzione tampone contenente siero animale e un colorante blu. Contiene azide sodica, 0.1% p/v. Pronto all'uso.

### FT<sub>4</sub>: Reagente Coniugato 1 flacone REF # T4C96

10 mL di coniugato T<sub>4</sub>-HRP in una soluzione tampone contenente un colorante violetto. Contiene Bronidox L, 0.2% v/v e Tiomersale 0.02% p/v. Pronto all'uso.

### Lavaggio concentrato 1 flacone REF # EWC96

50 mL di soluzione di lavaggio concentrata 15 volte. Contiene tiomersale, 0.09% p/v. Da diluire prima dell'uso.

### Tampone substrato 1 flacone REF # ESB20

20 mL di urea perossido in tampone citrato-fosfato. Contiene tiomersale, 0.01% p/v.

## Tavolette di substrato

### 1 flacone REF # EST4

4 x 4 mg, tavolette di ortofenilendiamina (OPD) piu' eccipienti

### FT<sub>4</sub>: Calibratori

### 6 flaconi REF # ET4S1-6

0.25 mL ciascuno in siero umano. Contiene azide sodica 0.1% p/v. Pronto all'uso.

## 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 di manipolare tutti i campioni con le precauzioni d'uso relative ai prodotti potenzialmente infettivi.

### CONSERVANTI

Il kit contiene azide sodica, tiomersale e Bronidox L come conservanti. La presenza di tali conservanti nei reattivi rende gli stessi potenzialmente tossici e pertanto consigliabile maneggiare i vari componenti del kit con attenzione, evitando l'ingestione o il contatto con la cute. L'azide sodica potrebbe reagire con le tubature in piombo o rame dei lavelli formando azoturi metallici potenzialmente esplosivi.

### SUBSTRATO

Evitare qualsiasi contatto con la cute.

## RACCOLTA E MANIPOLAZIONE DEI CAMPIONI

I pazienti non richiedono una preparazione particolare. Si possono utilizzare campioni sia di siero che plasma, raccolti in modo appropriato per le analisi di laboratorio. E' preferibile l'utilizzo di siero ma anche l'impiego di anticoagulanti quali eparina o EDTA non compromette l'accuratezza dell'analisi.

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. Verificare che i campioni scongelati non contengano materiale flocculato e mescolarli per inversione prima dell'uso. Centrifugare prima dell'uso i campioni torbidi o flocculati.

## MATERIALE RICHIESTO MA NON COMPRESO NEL KIT

- Acqua distillata o deionizzata
- 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Pipette di precisione
- Pipette a ripetizione
- Cilindro graduato da 1 litro
- Carta assorbente
- Contaminuti
- Agitatore vortex
- Lettore per micropiastre
- Agitatore per micropiastre
- Sistema di lavaggio per micropiastre

## NOTE PROCEDURALI

Portare i reattivi ed i campioni a temperatura ambiente (20-25°C) miscelandoli 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 vari passaggi della metodica devono essere eseguiti in successione evitando interruzioni. Se non e' 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.

## LAVAGGI

L'efficienza dei passi di lavaggio e' cruciale per garantire una buona precisione del metodo. Sarebbe opportuno usare un sistema automatico di lavaggio dei micropozzetti, in ogni caso evitare contaminazioni da trascinamento della soluzione di lavaggio da una micropiastrella all'altra.

## CONTROLLO DI QUALITA'

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

## PROCEDIMENTO

### 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.

### Soluzione Substrato

Si raccomanda che questa soluzione venga preparata immediatamente prima dell'uso. Per la preparazione aggiungere una compressa di OPD per ogni 5 mL di tampone substrato (aggiungere il corretto numero di compresse in base alla quantità di tampone necessario). Attendere il completo scioglimento delle compresse (1-2 minuti),appare e mescolare bene per inversione. Tenere al riparo dalla luce diretta. La soluzione di substrato deve essere impiegata entro 30 minuti al massimo dalla preparazione.

## Calibratori

Miscelare i flaconi per inversione. La concentrazione esatta di ogni calibratore, determinata lotto per lotto, è riportata su un foglio a parte all'interno del kit. Conservabili a -20°C fino a 4 settimane.

## Protocollo

1. Prelevare dalla confezione solo i micropozzetti necessari in base al numero di test richiesti. Richiudere la confezione e riporla a 2-8°C.
2. Pipettare 25 µL di campione (calibratore, controllo) in doppio nei micropozzetti appropriati. Dispensare i campioni in un tempo non superiore ai 40 minuti.
3. Pipettare 100 µL di Reagente Anticorpo FT<sub>4</sub> (blu) in ciascun micropozzetto.
4. Coprire la micropiastre con l'apposito coperchio ed incubare a temperatura ambiente (20-25°C) per 60 minuti su agitatore per micropiastre.
5. Al termine dell'incubazione, lavare i micropozzetti. Aspirare il liquido e risciacquare ciascun micropozzetto con 250 µL di soluzione di lavaggio, per quattro volte. Dopo il lavaggio finale, rovesciare i micropozzetti e picchiare contro carta assorbente per rimuovere ogni avanzo di soluzione di lavaggio. Assicurarsi che non rimangano bolle d'aria nei micropozzetti.
6. Pipettare 100 µL di Reagente Coniugato FT<sub>4</sub> (violetto) in ciascun micropozzetto.
7. Coprire i micropozzetti ed incubare su agitatore per micropiastre per 10 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).
8. Dopo l'incubazione ripetere la fase di lavaggio.
9. Pipettare 100 µL di soluzione substrato appena preparata in ciascun micropozzetto. Il tempo d'incubazione si calcola dal momento in cui viene aggiunta la soluzione di substrato al primo micropozzetto.
10. Coprire i micropozzetti ed incubare per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C) senza agitare.
11. Pipettare 50 µL di 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in ciascun micropozzetto seguendo le stesse sequenze e temporizzazioni dell'aggiunta della soluzione substrato.

## CALIBRAZIONE

I calibratori del kit sono stati ottenuti mediante dialisi all'equilibrio. I valori sono stati assegnati in unità (pmol/L). Per convertire in unità di misura tradizionali (ng/dL) usare la seguente equazione:

$$\text{ng/dl FT}_4 = \text{pmol/L FT}_4 \times 0.078$$

12. Leggere in end-point a 490 nm seguendo le indicazioni riportate sul manuale d'uso del sistema di lettura delle micropiastre. 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 una logistica a 4 parametri. Sulla curva di calibrazione identificare la DO dei campioni e risalire alla concentrazione, che verrà espressa in pmol/L di FT<sub>4</sub>. Il range del kit *ELEGANCE* ELISA FT<sub>4</sub> è compreso tra 0 e 125 pmol/L circa, minimo la concentrazione effettiva che può essere determinata è limitata dalla linearità del fotometro usato. Se il valore di DO del calibratore zero o del calibratore più basso è superiore alla capacità di lettura del fotometro, tale calibratore deve essere ommesso dal grafico della curva di calibrazione.

## Esempio di calcolo

Endpoint ID	DO media	FT <sub>4</sub> (pmol/L)
0	2.774	
4.99	2.412	
10.7	2.203	
25.7	1.650	
58.8	1.228	
125	1.036	
Campione 1	2.446	5.38
Campione 2	1.442	37.30
Campione 3	1.092	93.80

## LIMITI DEL METODO

I sieri di campioni che presentano visibilmente remolisi, lipemia o torbidità possono dare risultati falsati. Evitare campioni complementati o esposti a fonti di calore perché potrebbero dare valori falsamente elevati di FT<sub>4</sub> dovuti alla denaturazione delle protine leganti e all'alterazione dell'equilibrio tra T<sub>4</sub> libero e legato alle proteine. I campioni prelevati da pazienti sottoposti a terapia con anticorpi monoclonali di origine murina possono contenere anticorpi anti-topo ad alto titolo. Questi campioni possono produrre risultati falsamente alti o bassi e non sono analizzabili mediante questo kit.

## 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, espresso come intervallo di confidenza del 95%, è stato ottenuto dall'analisi di campioni di siero provenienti da individui in buona salute e viene proposto unicamente come traccia:

campioni eutiroidei	n = 159
valore medio	6.2 pmol/L
valori estremi	9.3 – 24.9 pmol/L
intervallo di riferimento	10.7 – 21.7 pmol/L

## CARATTERISTICHE DI PERFORMANCE

### Precisione entro la serie

Campione	n	media ± 2SD (pmol/L)	%CV
1	14	7.3 ± 1.4	9.6
2	14	14.8 ± 1.6	5.4
3	14	40.4 ± 2.1	2.6

### Precisione fra le serie

Campione	n*	media ± 2SD (pmol/L)	%CV
1	40	6.5 ± 1.9	14.6
2	40	17.8 ± 2.7	7.6
3	40	41.2 ± 4.5	5.5

\*duplicati

### Specificità

Analiti	% crossreattività
D-tiroxina	0.50
L-3,3',5-triidotironina (T <sub>3</sub> )	<0.01
L-3,3',5-triidotironina (rT <sub>3</sub> )	<0.01
L-3,5-diiodotirosina (DIT)	<0.01
Salicilato di sodio	<0.01
Acido O-acetilsalicilico	<0.01
Metimazolo	<0.01
Fenilbutazone	<0.01
5,5-difenilidantoina	<0.01

### SENSIBILITÀ

La sensibilità del metodo è inferiore a 2 pmol/L. 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 20 replicati del calibratore zero.

### INTERFERENZE

Non è stata osservata alcuna interferenza nel recupero analitico per concentrazioni di emoglobina fino a 250 mg/dL, bilirubina fino a 10 mg/dL, trigliceridi fino a 970 mg/dL e acidi grassi non esterificati fino a 4 mmol/L.

### INFORMAZIONI PER GLI ORDINI

Il kit *ELEGANCE* ELISA FT<sub>4</sub> 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 chiamando al numero +61 (0) 2 9517 1966 o il numero verde 1800 251 138.

PART No.: EKB41 Ed. 7

Data di Revisione: 17 Maggio 2009