



# **Userś Manual**

# IGF-I 600 ELISA

( (



DEM-DE4140



96 wells



# Contents / Inhaltsverzeichnis / Contenuti / Contenido / Contenu

1	INTRODUCTION 2	1	INTRODUZIONE	18
2	PRINCIPLE OF THE TEST2	2	PRINCIPIO DEL TEST	18
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS 3	3	PRECAUZIONI	18
4	REAGENTS4	4	COMPONENTI DEL KIT	19
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION 5	5	CAMPIONI	20
6	ASSAY PROCEDURE5	6	ATTUAZIONE DEL TEST	20
7	EXPECTED NORMAL VALUES 7	7	VALORI NORMALI	22
8	QUALITY CONTROL7	8	CONTROLLO QUALITÀ	22
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS 8	9	CARATTERISTICHE DEL TEST	23
10	LIMITATIONS OF USE9	10	LIMITAZIONE DEL TEST	23
11	LEGAL ASPECTS10	11	ASPETTI LEGALI	24
12	REFERENCES / LITERATURE10	12	BIBLIOGRAFIA	24
1	EINLEITUNG11	1	INTRODUCCIÓN	25
2	TESTPRINZIP11	2	FUNDAMENTO DEL ENSAYO	
3	VORSICHTSMAßNAHMEN11	3	PRECAUCIONES	
4	BESTANDTEILE DES KITS12	4	COMPONENTES DEL KIT	
5	PROBENVORBEREITUNG13	5	MUESTRAS	
6	TESTDURCHFÜHRUNG14	6	PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	
7	ERWARTETE WERTE15	7	VALORES ESPERADOS	
8	QUALITÄTS-KONTROLLE15	8	CONTROL DE CALIDAD	
9	ASSAY CHARACTERISTIKA16	9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	
10	GRENZEN DES TESTS16	10	LIMITACIONES DE USO	30
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN17	11	ASPECTOS LEGALES	31
12	REFERENZEN / LITERATUR17	12	REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA	31
		SYI	MBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS	32

#### 1 INTRODUZIONE

Il test immuno-enzimatico **DEMEDITEC IGF-I 600 ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa di IGF-I in siero.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

#### 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test IGF-1-600 ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo.

I campioni dei pazienti e i controlli sono acidificati e neutralizzati prima della attuazione del test. I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo diretto contro un unico sito antigenico della molecola IGF-1

I campioni pre-trattati sono incubati con il tracciante enzimatico (IGF-1 biotinilato) a temperatura ambiente. I pozzetti devono essere lavati e poi incubati con il complesso enzimatico (complesso streptavidina-HRP).

Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di IGF-1 nel campione del paziente.

#### 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA.
   Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la Stop Solution dovrebbe essere evitato perché contiene 1 N acidio soluzione.
  L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito.
  Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicchè le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta Demeditec Diagnostics GmbH.

#### 4 COMPONENTI DEL KIT

#### 4.1 Contenuto del kit

1. **1 M** *HCI*, 1 flacone, 3 mL, pronto all'uso; per la acidificazione dei campioni.

2. **Neutralization Buffer**, 1 flacone, 3 mL, pronto all'uso; per la neutralizzazione.

3. *Microtiterwells* (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti Pozzetti ricoperti con l'anti-IGF-1 anticorpo (monoclonale)

4. Standard (Standard 0-6), 7 flaconi, 1 mL, pronto all'uso

Concentrazioni: 0 - 5 - 10 - 50 - 150 - 300 - 600 ng/mL

Conversione: 1 ng/mL x 0.13 = nmol/L

Gli standard sono calibrati contro lo "International Reference Reagent, IRR" per IGF-1,

NIBSC code: 87/518

Contiene conservante senza mercurio.

5. Control Low & High (Controllo), 2 flaconi, 1 mL, pronto all'uso

I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC.

Contiene conservante senza mercurio.

 Enzyme Conjugate (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso IGF-1 biotinilato

Contiene conservante senza mercurio.

7. *Enzyme Complex* (Complesso enzimatico), 1 flacone, 20 mL, pronto all'uso; complesso streptavidina-HRP.

Contiene conservante senza mercurio.

- 8. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso TMB (benzidine tetrametilico)
- Stop Solution (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; contiene 1 N acido soluzione

Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.

10. *Wash Solution* (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X) vedi "preparazione dei reagenti"

Nota: Ulteriore Standard 0 per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

## 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Uno spettrofotometro calibrato per micropozzetti (450 ± 10 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile.
- Carta assorbente.
- Acqua distillata.
- 1.5 mL tubetti (p.es. Eppendorf) per la preparazione dei campioni (acidificazione e neutralizzazione)
- Carta indicatore pH

## 4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2  $^{\circ}$ C a 8  $^{\circ}$ C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente. Test kits aperti rimangono attivi per 6 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

#### 4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

#### Wash Solution

Diluire 30 mL Wash Solution concentrata con 1170 mL di acqua deionizzata fino ad un volume finale di 1200 mL.

La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.

#### 4.5 Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

#### 4.6 Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al piu' tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino ala soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

#### 5 CAMPIONI

Siero può essere usato per questo test.

**NOTA:** I risultati Plasma sono molto diminuiti. Non usare campioni emolitici, itterici o lipemici.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

#### 5.1 Collezione dei campioni

#### Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

I campioni devono essere analizzati immediatamente.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (almeno 1 anno) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 ℃ prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

#### 5.3 Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard piu' alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato. Della diluizione deve essere però tenuto conto.

#### Esempio:

a) diluizione 1:10: 10 μL siero + 90 μL Standard 0 (agitare bene)

b) diluizione 1:100: 10 μL della diluizione a) + 90 μL *Standard 0* (agitare bene).

#### **6 ATTUAZIONE DEL TEST**

#### 6.1 Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

#### 6.2 Acidificazione e neutralizzazione dei campioni e degli standard/controllo

- Pipettare 200 μL dei campioni e degli standard / controllo in 1.5 mL tubetti (p.es. Eppendorf).
   Nota bene: Anche gli standard devono essere acidificati e neutralizzati secondo la metodica descritta sotto.
- 2. Aggiungere 20 µL 1 N HCI
- 3. Mescolare e incubare per 15 minuti.
- Per la neutralizzazione aggiungere 20 μL Neutralization Buffer a tutti i tubetti e mescolare la soluzione.

Revisione e correzione del valore del pH non è necessaria.

Immediatamente continuare con il punto 6.3 "Eseguimento del test".

# 6.3 Eseguimento del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

- 1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
- 2. Pipettare **50 μL** di ogni **Standard, controllo e campioni** acidificati e neutralizzati, nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
- Pipettare 100 μL Enzyme Conjugate in ogni pozzetto.
  Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
- 4. Incubare per **120 minuti** a temperatura ambiente (senza coptire la piastra).
- 5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.

Lavare i pozzetti **3 volte** con soluzione di lavaggio diluita (400  $\mu$ L in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.

#### Importante:

La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguimento del lavaggio!

- 6. Pipettare 150 μL Enzyme Complex in ogni pozzetto.
- 7. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente (senza coptire la piastra).
- Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.
  Lavare i pozzetti 3 volte con soluzione di lavaggio diluita (400 μL in ogni pozzetto). Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
- 9. Aggiungere 100 µL Substrate Solution ad ogni pozzetto.
- 10. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente.
- 11. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo 100 μL Stop Solution ad ogni pozzetto.
- 12. Determinare la densità ottica a **450 ± 10 nm** con un fotometro per microtiter-piastre **entro 10 minuti** dopo l'aggiunta della Stop Solution.

#### 6.4 Rilevamento dei risultati

- 1. Determinare i valori medi della densità ottica per ogni set di standard, controlli e campioni.
- 2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (OD) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle OD si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
- 3. Utilizzando il valore medio delle OD per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
- 4. Metodo automatico: I risultati in IFU sono stati calcolati automaticamente usando un (fitting) avvicinamento con il 4 PL (4 Parameter Logistics). Altri funzioni usati per l'elaborazioni dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
- 5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione piu' elevata dello standard piu' concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

#### 6.4.1 Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'eseguimento del test.

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Standard 0 (0 ng/mL)	1,94
Standard 1 (5 ng/mL)	1,69
Standard 2 (10 ng/mL)	1,49
Standard 3 (50 ng/mL)	0,93
Standard 4 (150 ng/mL)	0,56
Standard 5 (300 ng/mL)	0,44
Standard 6 (600 ng/mL)	0,33

#### 7 VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

Bambini in eta' pre-puberta' (3-8 anni): 20 – 250 ng/mL

Bambini piccoli con un basso peso corporeo possono avere valori sotto i 50 ng/mL.

Adolescenti alla puberta' (11-16 anni): 130 – 600 ng/mL Adulti dopo la puberta': 150 – 350 ng/mL

Nota: Il livello di IGF-1 puo' leggermente decrescere con l'eta.

#### 8 CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati.

È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati.

Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

#### 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

#### 9.1 Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 1,29 - 600 ng/mL.

#### 9.2 Sensitività analitica

La sensitività <u>analitica</u> è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 1,29 ng/mL.

#### 9.3 Precisione

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

#### 9.4 Ritrovato

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

#### 9.5 Linearità

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

#### 10 LIMITAZIONE DEL TEST

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare I risultati.

#### 10.1 Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 2 mg/mL), bilirubina (fino a 0.25 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

#### 10.2 Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di IGF-I nel campione.

#### 10.3 Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

#### 11 ASPETTI LEGALI

#### 11.1 Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

#### 11.2 Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

#### 11.3 Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

#### 12 BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

# SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISAS

Symbol	English	Deutsch	Français	Español	Italiano
C€	European Conformity	CE-Konfirmitäts- kennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
[]i	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
IVD	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Para uso Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
RUO	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
REF	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
LOT	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
$\sum$	Contains sufficient for <n> tests/</n>	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos</n>	Contenuto sufficiente per "n" saggi
1	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Température de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
$\square$	Expiration Date	Mindesthaltbarkeits- datum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
***	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
Distributed by	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore
Content	Content	Inhalt	Contenu	Contenido	Contenuto
Volume/No.	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Numéro	Volumen/Número	Volume/Quantità
Microtiterwells	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Plaques de micro- titration	Placas multipocillo	Micropozzetti
Antiserum	Antiserum	Antiserum	Antisérum	Antisuero	Antisiero
Enzyme Conjugate	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Conjugué enzymatique	Conjugado enzimático	Tracciante enzimatico
Enzyme Complex	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complexe enzymatique	Complex enzimático	Complesso enzimatico
Substrate Solution	Substrate Solution	Substratlösung	Solution substrat	Solución de sustrato	Soluzione di substrato
Stop Solution	Stop Solution	Stopplösung	Solution d'arrêt	Solución de parada	Soluzione d' arresto
Zero Standard	Zero Standard	Nullstandard	Zero Standard	Estándar cero	Standard zero
Standard	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
Control	Control	Kontrolle	Contrôle	Control	Controllo
Assay Buffer	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampon d'essai	Tampón de ensayo	Tampone del test
Wash Solution	Wash Solution	Waschlösung	Solution de lavage	Solución de lavado	Soluzione di lavaggio
1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)
1 N HCI	1 N HCI	1 N HCI	1N HCI	1 N HCI	
Sample Diluent	Sample Diluent	Probenverdünnungs- medium	Solution pour dilution de l'échantillon	Solución para dilución de la muestra	Diluente dei campioni
Conjugate Diluent	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungs- medium	Solution pour dilution du conjugué	Solución para dilución del conjugado	Diluente del tracciante









