

Istruzioni d'uso
Life Science Kits & Assays



phosphoTAU ELISA



Numero di ordinazione:

847-0108000104 96 reazioni

Edizione: Manual_phosphoTAU ELISA_d_rev6

Questo documento descrive lo stato al momento della pubblicazione e non deve necessariamente corrispondere a versioni future. Con riserva di modifica!

Stampa e utilizzo consentiti solo con l'indicazione della fonte.

© Copyright 2018, Analytik Jena AG, AJ Roboscreen GmbH

Produttore:

AJ Roboscreen GmbH
Hohmannstraße 7
04129 Leipzig
Made in Germany!

Telefono +49 341 989734 0
Fax +49 341 989734 199

Editore:

Analytik Jena AG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena · Germany

www.analytik-jena.com
info@analytik-jena.com

Indice

1	Introduzione	2
1.1	Destinazione d'uso	2
1.2	Garanzia e assistenza tecnica	2
1.3	Avvertenze su come utilizzare le istruzioni d'uso	3
2	Avvertenze di sicurezza	4
3	Principio del test	6
4	Valutazione del rendimento	7
5	Componenti del kit	9
6	Preparazione dei componenti	11
6.1	Soluzione di lavaggio 1X	11
6.2	Campioni D3.1 - D3.6	11
6.3	Controlli D7 e D8	11
6.4	Coniugato HRP 1X	12
7	Conservazione e data di scadenza	13
8	Componenti non compresi nel kit	13
9	Istruzioni di esecuzione	14
10	Prelievo e conservazione dei campioni	14
10.1	Prelievo dei campioni	15
10.2	Conservazione dei prelievi	15
10.3	Diluizione dei prelievi	15
11	Svolgimento del test	16
12	Analisi dei dati	17
12.1	Criteri di qualità del test	17
12.2	Calcolo della concentrazione di tau fosforilata non conosciuta	17
13	Valori stimati	18

1 Introduzione

1.1 Destinazione d'uso

phosphoTAU ELISA è un test immunoenzimatico per la determinazione dei livelli di tau fosforilata nel liquido cefalorachidiano (LCR) umano che contribuisce alla diagnosi del morbo di Alzheimer. Lo sviluppo del morbo di Alzheimer (AD) è caratterizzato da tre stadi, così definiti dal "US National Institute on Aging workgroups":

- uno stadio preclinico di AD,
- lo stadio di compromissione cognitiva lieve (MCI) dovuta ad AD e
- lo stadio di demenza dovuta ad AD.

La misurazione tau fosforilata mostra una specificità e sensibilità diagnostica almeno comparabile agli altri test diagnostici disponibili per la determinazione del morbo di Alzheimer.

1.2 Garanzia e assistenza tecnica

Il produttore garantisce il funzionamento corretto del test se eseguito conformemente alle istruzioni d'uso. Durante il periodo coperto dalla garanzia phosphoTAU ELISA fornisce dati precisi e riproducibili, con un'ottima sensibilità. La garanzia sarà valida solo se verrà applicata la buona pratica di laboratorio (BPL) e se verranno osservate le istruzioni del produttore.

Per migliorare l'applicazione o il design, Analytik Jena AG si riserva il diritto di sostituire o modificare il kit. Il produttore può essere contattato in qualsiasi momento per chiarimenti tecnici in merito alla quantificazione dei livelli di tau fosforilata in LCR.








CONSULTARE LE ISTRUZIONI D'USO



Leggere attentamente queste istruzioni d'uso prima di utilizzare il kit. Attenersi alle istruzioni d'uso. In caso d'inosservanza delle istruzioni d'uso non si potrà garantire l'affidabilità dei risultati.

1.3 Avvertenze su come utilizzare le istruzioni d'uso

Per maggiore semplicità di rappresentazione e orientamento le presenti istruzioni d'uso utilizzano i seguenti simboli:

	Riferimento Numero di catalogo
	Contenuto Contiene reagenti sufficienti per <N> test
	Condizioni di temperatura di stoccaggio
	Consultare le istruzioni d'uso
	Data di scadenza
	Prodotto da
	Monouso

Si utilizzano le seguenti abbreviazioni:

AD	Alzheimer's disease (morbo di Alzheimer)
LCR	Liquido cefalorachidiano
CV	Coefficiente di variazione
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima)
BPL	Buona pratica di laboratorio
HRP	Horseradish peroxidase (perossidasi del rafano)
DO	Densità ottica
TA	Temperatura ambiente (18-25°C)
TMB	Tetrametilbenzidina

2 Avvertenze di sicurezza

Per garantire la sicurezza dell'utilizzatore e la corretta applicazione, si raccomanda di leggere attentamente questo capitolo prima di utilizzare il kit. Attenersi sempre a tutte le avvertenze di sicurezza ed alle informazioni contenute nelle presenti istruzioni d'uso.

Leggere completamente le istruzioni d'uso ed assicurarsi di averle comprese totalmente prima di utilizzare il kit.

Se il kit presenta danni sostanziali, informare per iscritto il fornitore entro una settimana dalla consegna. I componenti danneggiati non devono essere utilizzati per eseguire il test, ma andranno conservati fino al completo chiarimento dei motivi che hanno portato ai danni da trasporto.

Osservare la buona pratica di laboratorio e le avvertenze di sicurezza. Quando necessario, utilizzare sempre indumenti da laboratorio, guanti monouso e occhiali di protezione.

I reagenti del kit che contengono sostanze pericolose possono causare danni agli occhi ed alla cute. Osservare le avvertenze riportate al capitolo COMPONENTI DEL KIT e sulle etichette. Su richiesta sono disponibili le schede dei dati di sicurezza del prodotto.

Tutti i reagenti dovranno essere gestiti come rifiuto pericoloso e conformemente alle norme nazionali in materia.

Il personale addetto alle pulizie dovrà essere istruito da persone competenti in merito ai rischi potenziali ed alla gestione di tali sostanze.

Evitare qualsiasi contatto diretto con la soluzione di arresto. Può causare danni alla cute e ustioni chimiche.



MONOUSO!

Il kit è concepito monouso!

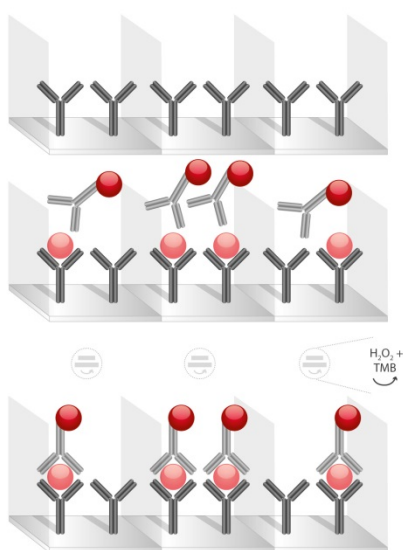
ATTENZIONE!

Non ingerire i componenti del prodotto!

Il kit dovrà essere utilizzato esclusivamente da personale esperto di laboratorio e in ambiente di laboratorio!

3 Principio del test

Il test utilizza un anticorpo monoclonale che riconosce specificamente la proteina tau fosforilata nel range degli aminoacidi 1-200 e che è stato immobilizzato sulla superficie della piastra per microtitolazione. La proteina tau fosforilata proveniente da prelievi, campioni e controlli viene catturata da questo anticorpo, seguita dalla rivelazione attraverso un ulteriore anticorpo monoclonale coniugato con HRP, che lega specificamente gli aminoacidi 155-165 della proteina umana tau. La quantità dell'anticorpo coniugato legato viene determinata utilizzando il substrato cromogeno tetrametilbenzidina (TMB). La concentrazione della proteina tau è proporzionale alla densità ottica misurata.



1. Pronto per l'uso: anticorpo di cattura nelle cavità della piastra.
2. L'anticorpo di cattura e l'anticorpo secondario legano la proteina tau umana.
3. Rivelazione della tau legata grazie all'anticorpo coniugato con HRP.

4 Valutazione del rendimento

La tabella mostra un esempio di dati tipici della curva di calibrazione e non può essere utilizzata per il calcolo.

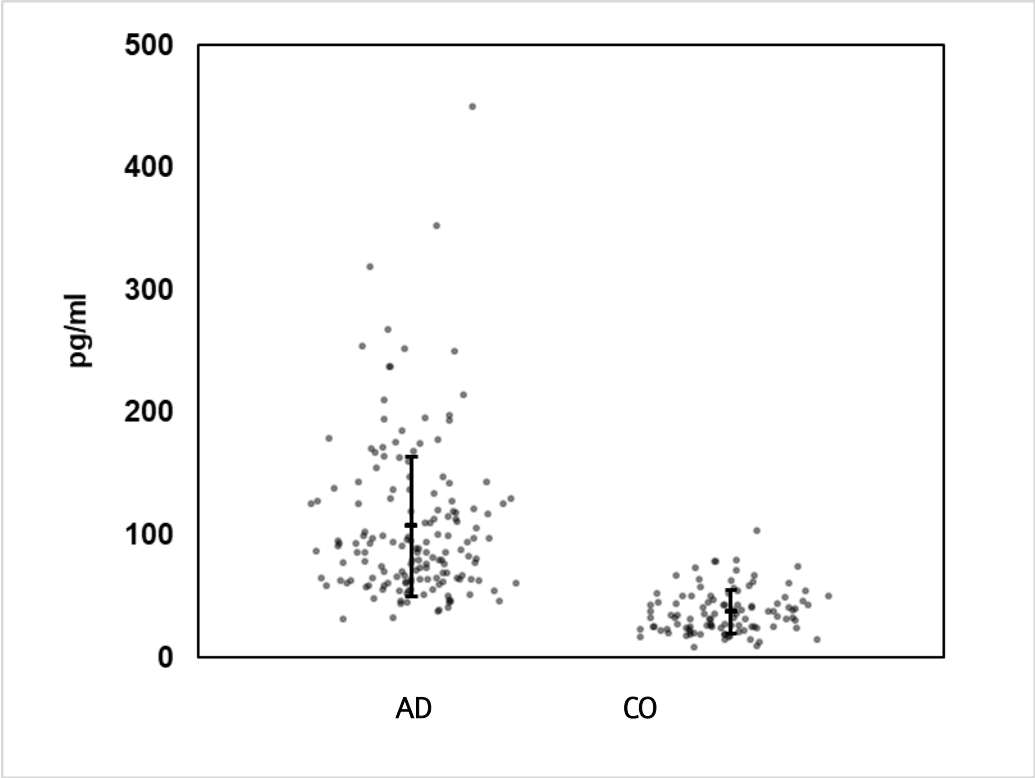
Campione	tau fosforilata (pg/ml)	18 h d'incubazione (6 ± 4 °C)	
		DO _{mean}	DO/DO _{max} (%)
D3.1	600	2.848	100
D3.2	200	0.759	26
D3.3	100	0.412	14
D3.4	50	0.231	8.1
D3.5	25	0.160	5.6
D3.6	5	0.092	3.2

La tabella rappresenta la sensibilità e la specificità rilevate in rapporto al valore critico determinato.










Sensibilità analitica (limite di rivelabilità)	5 pg/mL	Media della DO del controllo negativo (BIANCO) + 3 x SD
Valore critico	60 pg/mL	Ogni laboratorio deve rilevare il proprio livello di valore critico.
Sensibilità clinica	82,2 %	Pazienti AD/MCI (n=157)
Specificità clinica	87,5 %	Controlli (n=104)

Valutazione del rendimento




Calcolo delle differenze rilevanti ($p < 0,001$) della concentrazione di proteina tau fosforilata mediante phosphoTAU ELISA tra campioni di LCR di pazienti con morbo di Alzheimer ($n=157$) e pazienti di controllo ($n=104$).



5 Componenti del kit

Componente	 96	Descrizione
Piastra per microtitolazione D1	12 x 8	Strisce rivestite che contengono anticorpi anti-tau fosforilata, bloccate e stabilizzate. Pronte per l'uso.
Tampone di lavaggio 40X D2	1 x 50 ml	Tampone di lavaggio 40X contenente PBS, detergente e Proclin 300.
Campioni	6 x 3	Campioni di tau fosforilata essiccata (STD) per la produzione di una curva di calibrazione per la quantificazione della tau fosforilata in prelievi sconosciuti di LCR. Contengono PBS, proteina e Proclin 300.
D3.1	 3	600 pg tau fosforilata
D3.2	 3	200 pg tau fosforilata
D3.3	 3	100 pg tau fosforilata
D3.4	 3	50 pg tau fosforilata
D3.5	 3	25 pg tau fosforilata
D3.6	 3	5 pg tau fosforilata
Controllo negativo D4	 1 ml	Controllo negativo (BIANCO), contiene PBS, proteina, detergente e Proclin 300. Pronto per l'uso.
Coniugato HRP 2X D5	 4 ml	Anticorpo monoclonale anti-tau coniugato con perossidasi del rafano, concentrato 2X, contiene TRIS, albumina, detergente e stabilizzatori (Kathon, Bronidox).
Tampone di diluizione D6	50 ml	Tampone di diluizione contiene carbonato, proteina, detergente e Proclin 300. Pronto per l'uso.

Componenti del kit

Componente	 96	Descrizione
Controllo alto D7	3 	Controllo positivo tau fosforilata essiccata alta (CTRL), contiene PBS, proteina e Proclin 300.
Controllo basso D8	3 	Controllo positivo tau fosforilata essiccata bassa (CTRL), contiene PBS, proteina e Proclin 300.
Soluzione cromogena D9	20 ml	TMB/soluzione al perossido. Pronta per l'uso.
Soluzione di arresto D10	25 ml	1 M acido solforico. Pronta per l'uso.
Pellicola adesiva	1	
Istruzioni d'uso	1	

6 Preparazione dei componenti

6.1 Soluzione di lavaggio 1X

Diluizione del tampone di lavaggio 40X D2 utilizzando acqua deionizzata o bidistillata prima di eseguire la prima operazione di lavaggio nel test.

Volume di soluzione di lavaggio 1X	Volume di tampone di lavaggio 40X D2	Volume di acqua deionizzata o bidistillata
400 ml	10 ml	390 ml
600 ml	15 ml	585 ml
800 ml	20 ml	780 ml
1000 ml	25 ml	975 ml

6.2 Campioni D3.1 - D3.6

Aggiungere 0,5 ml di tampone di diluizione D6 ad ogni provetta D3.1 – D3.6 e mischiare brevemente, per esempio per 2 secondi con agitatore a vortice.

6.3 Controlli D7 e D8

Aggiungere 0,5 ml di tampone di diluizione D6 ad ogni provetta D7 e D8 e mischiare brevemente, per esempio per 2 secondi con agitatore a vortice.

6.4 Coniugato HRP 1X

Diluizione del coniugato HRP 2X D5 in rapporto 1:2 utilizzando il tampone di diluizione D6. Mescolare agitando la provetta.

Numero di strisce immunologiche	Volumi di HRP 2X D5	Volumi di tampone di diluizione D6
1 - 4	1 ml	1 ml
5 - 8	2 ml	2 ml
9 - 12	3 ml	3 ml

7 Conservazione e data di scadenza

Il kit viene fornito a temperatura ambiente e dovrebbe essere conservato a $6 \pm 4^\circ\text{C}$. Proteggere il kit dal calore e dalla radiazione solare. In queste condizioni il kit ha la durata di conservazione indicata sulla confezione mantenendo immutate efficacia e stabilità. I componenti preparati ed aperti hanno la seguente durata di conservazione:

Componente	Preparazione	Conservazione
D1	Strisce immunologiche rivestite, dopo l'apertura estrarre le strisce e richiudere la confezione.	A $6 \pm 4^\circ\text{C}$ fino a 4 settimane.
D2	Soluzione di lavaggio 1X pronta per l'uso.	A $6 \pm 4^\circ\text{C}$ fino a 1 settimana.
D3.1-D3.6	Campioni D3.1-D3.6 diluiti in D6.	A $6 \pm 4^\circ\text{C}$ fino a 4 h.
D7, D8	Controlli D7 e D8 diluiti in D6.	A $6 \pm 4^\circ\text{C}$ fino a 4 h.
D5	Coniugato HRP 1x pronto per l'uso.	A $6 \pm 4^\circ\text{C}$ fino a 4 h.

8 Componenti non compresi nel kit

- Micropipette calibrate con $\text{CV} < 3\%$, volume: 10-100 μL ; 100-1000 μL .
- Micropipetta a 8 canali con serbatoi per reagenti.
- Agitatore di piastra 100-1500 rpm per es. Rotamax 120. Vortexer.
- Lavapiastre ELISA automatico o semiautomatico.
- Acqua bidistillata o deionizzata.
- Cellulosa, puntali di pipette, cronometro.
- Lettore di piastre ELISA con assorbimento a 450 e 620 nm.
- Provetta in polipropilene per la diluizione dei campioni.

9 Istruzioni di esecuzione

La gestione scorretta dei campioni e la variazione dello svolgimento del test possono influire sui risultati. Ci si dovrà attenere strettamente alle indicazioni in merito ai volumi, ai tempi d'incubazione, alle temperature e alle operazioni di pretrattamento.

Prima di procedere, assicurarsi che siano stati preparati i reagenti, i materiali e gli strumenti necessari. La soluzione cromogena **D9** dovrà essere portata a temperatura ambiente (21.5 ± 3.5 °C). Il tampone di diluizione **D6** e il coniugato HRP 2X **D5** dovranno essere miscelati prima dell'uso.

Proteggere dalle contaminazioni i reagenti, le pipette, le strisce immunologiche e le provette utilizzando diversi articoli monouso per i diversi campioni e componenti. Non utilizzare più di una volta le cavità, le provette o i reagenti.

Si consiglia di dispensare in duplicato e di utilizzare uno schema di pipettazione.

La soluzione di coniugato HRP 1X, la soluzione cromogena **D9** e la soluzione di arresto **D10** dovranno essere trasferite sulle strisce immunologiche con una pipetta a 8 canali.

Il lavaggio dovrà essere effettuato con una pipetta a 8 canali o con un lavapiastre ELISA. Evitare che le strisce immunologiche si seccino o si rovinino e controllare il lavaggio accurato di tutte le cavità.

10 Prelievo e conservazione dei campioni

La "Alzheimer's Biomarker Standardization Initiative" fornisce le seguenti raccomandazioni per gli aspetti preanalitici ed analitici del testaggio di biomarcatori AD in LCR (Vanderstichele et al., Standardization of preanalytical aspects of cerebrospinal fluid biomarker testing for Alzheimer's disease diagnosis: a consensus paper from the Alzheimer's Biomarkers Standardization Initiative. *Alzheimers Dement.* 2012 Jan;8(1):65-73).

10.1 Prelievo dei campioni

La puntura lombare può essere eseguita tra le vertebre L3-L5 sul paziente seduto o sdraiato. Utilizzare aghi sottili (0,7 mm, 22 G), possibilmente non traumatici. Gli aghi sottili gauge producono fori più piccoli nella dura mater, facilitando la guarigione. L'utilizzo di aghi non traumatici riduce il rischio di contaminazioni ematiche del LCR.

Tutti i laboratori dovrebbero utilizzare provette in polipropilene. Non utilizzare in nessun caso provette di vetro o di polistirene. Utilizzare provette del volume minimo possibile, riempite almeno al 50%. Allo stoccaggio è importante registrare tutti i dettagli di ogni campione per avere uno storico preciso del campione ad ogni utilizzo.

La centrifugazione è necessaria solo per i campioni visibilmente emorragici. La centrifugazione rapida dovrà essere realizzata a 2000 x g ed una temperatura ambiente per 10 minuti.

10.2 Conservazione dei prelievi

Si consiglia di congelare e conservare i prelievi ad una temperatura di -80°C. Si consiglia di limitare i cicli di scongelamento e congelamento ad un massimo di 1-2 volte. Non conservare i prelievi per più di 2 anni.

Avvertenza

Per la diluizione di LCR utilizzare provette in polipropilene. In alternativa la diluizione può essere realizzata direttamente sulla piastra D1.

10.3 Diluizione dei prelievi

Nel caso di prelievi che presentano una DO maggiore della DO del campione D3.1 maggiore, si dovrà procedere ad una diluizione superiore a 1:2 con tampone di diluizione D6.

11 Svolgimento del test

1. Pipettare 50 µl di coniugato HRP 1X in ogni cavità e quindi 50 µl di campione, controlli e prelievi dai pazienti **in ogni rispettiva cavità della piastra**. La sequenza può essere invertita.
2. Mischiare con un agitatore di piastre (per es. 1 min. a 700 rpm) o manualmente pipettando 2-3 volte.
3. Chiudere la piastra di microtitolazione con il coperchio o con pellicola adesiva.
4. Incubare la piastra di microtitolazione per **18 ± 1 h a 6 ± 4 °C**.
5. Lavare la piastra 5 x con 300 µl di soluzione di lavaggio 1X per cavità utilizzando un lavapiastre ELISA automatico.

Avvertenza

In alternativa in esecuzione manuale è possibile versare le soluzioni e battere le strisce immunologiche su cellulosa.

6. Pipettare 100 µl di **soluzione cromogena D9** in ogni cavità.
7. Incubare la piastra a TA al buio per 30 minuti.
8. Arrestare il substrato aggiungendo 150 µl di **soluzione di arresto D10** in ogni cavità. Mischiare con cautela le cavità riempite nel lettore di piastre.
9. La misurazione della densità ottica dovrà essere realizzata con un fotometro (lettore di piastre) a 450 nm contro una lunghezza d'onde di riferimento di 620 nm, entro 15 minuti dopo l'aggiunta della **soluzione di arresto D10**.

Avvertenza

Nel caso di prelievi con un contenuto di tau fosforilata elevato è possibile che si verifichi la precipitazione del colorante per la reazione molto intensa. Per questo motivo non si dovrebbe attendere più di 15 minuti.

12 Analisi dei dati

12.1 Criteri di qualità del test

- $DO_{450/620\text{ nm}}$ del controllo negativo **D4** (BIANCO) dovrebbe essere $< 0,1$.
- La concentrazione del controllo positivo **D7** dovrebbe essere > 60 pg/ml e quella del controllo positivo **D8** < 60 pg/ml.
- $DO_{450/620\text{ nm}}$ del campione **D3.1** dovrebbe essere $> 2,0$.
- Per ogni esecuzione l' R^2 delle dispensazioni in duplicato della curva di calibrazione dovrebbe essere $> 0,99$.

12.2 Calcolo della concentrazione di tau fosforilata non conosciuta

Per determinare la concentrazione di tau fosforilata nei controlli e nei prelievi si consiglia l'utilizzo di valori logaritmizzati (LN) delle DO standard e concentrazioni standard da applicare all'asse X (DO) e all'asse Y (concentrazione) di un diagramma lineare o per eseguire un'analisi di regressione lineare. I valori logaritmizzati delle DO misurate dei prelievi devono essere utilizzati per questa analisi della regressione al fine di calcolare la concentrazione in pg/ml o ng/l con la successiva funzione esponenziale.

Per la quantificazione si può utilizzare anche l'analisi automatica dei dati dei comuni software di lettura; si consiglia la regressione logistica con 4 o 5 parametri o il metodo Logit-log. La curva di calibrazione mostra tipicamente un andamento lineare tra il plateau del campione maggiore **D3.1** (600 pg/ml) e il plateau del campione minore **D3.6** (5 pg/ml).

Avvertenza

Per i prelievi che presentano una DO misurata più bassa della DO del campione minore **D3.6** si calcolerà una concentrazione di proteina TAU fosforilata di 2,5 pg/ml, ovvero 1/2 concentrazione del campione **D3.6**, se non sussiste la possibilità di aumentare la concentrazione del prelievo.

13 Valori stimati

Avvertenza

I valori stimati sono stati calcolati dalla prima convalida clinica del test. I dati così rilevati devono pertanto essere considerati provvisori.

Valori stimati applicando il protocollo con 18 h d'incubazione.

Per un gruppo di 157 pazienti AD è stato rilevato un valore medio di 107 pg/ml con un range minimo/massimo di 31 – 450 pg/ml, mentre per un gruppo di pazienti di controllo (n=104) si è trovato un valore medio di 37 pg/ml con un range di 9 – 104 pg/ml.

Sede principale

Analytik Jena AG
Konrad-Zuse-Str. 1
07745 Jena · Germany

Telefono +49 3641 77 70
Fax +49 3641 77 9279
info@analytik-jena.com
www.analytik-jena.com

Fotografie: Analytik Jena AG

Con riserva di modifiche per quanto riguarda esecuzione e fornitura nonché gli sviluppi tecnici!