



DCM003-11
Ed. 01/2015

ESTRADIOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del 17 β -Estradiolo nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO003

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del 17 β -Estradiolo nel siero o plasma umano.

Il kit Estradiol ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Estradiolo (17 β -Estradiol) è un ormone sessuale. Rappresenta l'estrogeno principale negli esseri umani. L'Estradiolo ha effetto sul funzionamento riproduttivo e sessuale, e interessa altri organi compresa la struttura dell'osso. Durante gli anni fertili la maggior parte dell'Estradiolo nelle donne è prodotto dalle ovaie, piccole quantità sono prodotte dalla corteccia surrenale. Negli uomini, i testicoli producono l'Estradiolo. Nel plasma l'Estradiolo è legato alla globulina legante gli ormoni sessuali (SHBG), e all'albumina, - soltanto la frazione libera è biologicamente attiva. La quantità di Estradiolo sierico nelle donne riflette soprattutto l'attività delle ovaie. I livelli di estrogeni durante la gravidanza aumentano costantemente fino al termine della stessa. Aumenti dei livelli di Estradiolo portano alla sintesi della placenta. Nelle donne in premenopausa, la produzione ovarica di Estradiolo è stimolata dall'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) durante il ciclo mestruale.

Nelle donne, i livelli di Estradiolo misurano la fertilità e le irregolarità mestruali e sono necessari per controllare la funzionalità dei follicoli ovarici durante l'induzione dell'ovulazione. Nelle donne, l'Estradiolo funge da ormone per lo sviluppo dei tessuti degli organi riproduttivi e guida lo sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie, esso è coinvolto anche nella fertilità maschile. L'Estradiolo regola il mantenimento della massa ossea. Donne in menopausa subiscono una perdita accelerata della massa dell'osso dovuta alla mancanza di estrogeni. L'Estradiolo interessa la sintesi delle proteine, come le lipoproteine, delle proteine carrier e delle proteine responsabili della coagulazione. Gli estrogeni hanno funzione neuroprotettiva. L'Estradiolo, per la sua attività, è coinvolto in alcuni tipi di cancro, come il cancro al seno e il cancro del rivestimento uterino. In più ci sono parecchie circostanze ginecologiche benigne che dipendono dagli estrogeni quali ad esempio l'endometriosi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il 17 β -Estradiolo (antigene) presente nel campione compete con il 17 β -Estradiolo antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-17 β -Estradiolo adsorbito su micropiastra (fase solida). Dopo l'incubazione la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima HRP presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H₂O₂) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop solution (H₂SO₄). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del 17 β -Estradiolo presente nel campione. La concentrazione di 17 β -Estradiolo nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi)

CAL0 (1 mL)	REF DCE002/0306-0
CAL1 (0,5 mL)	REF DCE002/0307-0
CAL2 (0,5 mL)	REF DCE002/0308-0
CAL3 (0,5 mL)	REF DCE002/0309-0
CAL4 (0,5 mL)	REF DCE002/0310-0
CAL5 (0,5 mL)	REF DCE002/0311-0

2. Control (1 vial, 0,5 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/0303-0**

3. Conjugate (1 flacone, 22 mL)

17 β -Estradiolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/0302-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti-17 β -Estradiolo adsorbito su micropiastra **REF DCE002/0303-0**

5. TMB Substate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE004-0**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 M (evitare il contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. 10X Conc. Wash Solution (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata

3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

Letto per micropiastre (450 nm, 620-630 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a $2\pm 8^\circ\text{C}$, al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 4 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di 17 β -Estradiolo da 20 pg/mL a 2000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di 17 β -Estradiolo.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di $2-8^\circ\text{C}$ nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.
- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente ($22-28^\circ\text{C}$) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le

fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₅)

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di 17 β -Estradiolo:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili a $2-8^\circ\text{C}$ per sei mesi.

6.2. Preparazione del Coniugato

Coniugato pronto all'uso. Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Stabile 6 mesi a $2\pm 8^\circ\text{C}$ dall'apertura del flacone

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a $2\pm 8^\circ\text{C}$ per almeno 30 giorni. Nella wash solution concentrata è possibile osservare la presenza di cristalli, in tal caso agitare a temperatura ambiente fino a completa dissoluzione dei cristalli, per una maggiore precisione diluire tutto il flacone della soluzione di lavaggio

concentrata a 500 mL avendo cura di trasferire anche i cristalli, poi agitare fino a completa dissoluzione.

6.4. Preparazione dei Campioni

La determinazione del 17 β -Estradiolo può essere effettuata su siero o su plasma umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione. Prima dell'uso lasciare almeno 5 minuti su agitatore rotante. Il Controllo è pronto all'uso.

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	25 μ L		
Campione /Controllo		25 μ L	
Conjugate	200 μ L	200 μ L	
Incubare 2 h a +37°C. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 μ L di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente 22÷28°C, al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Estradiolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati sperimentali o nella degradazione dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C₀-C₅) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare, dal grafico, i valori di assorbanza relativi a ciascun campione e leggerne la corrispondente concentrazione in pg/mL.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche di 17 β -Estradiolo sono comprese nei seguenti intervalli:

		pg/mL
DONNE	Fase follicolare	30 – 100
	Picco Ovulatorio	130 – 350
	Fase Luteinica	50 – 180
	Menopausa	< 60
BAMBINI		< 40
UOMINI		< 60

È importante tenere presente che la determinazione di un range di valori attesi in un dato metodo per una popolazione "normale" è dipendente da molteplici fattori, quali la specificità e sensibilità del metodo in uso, e la popolazione in esame. Perciò ogni laboratorio dovrebbe considerare i range indicati dal Fabbricante come un'indicazione generale e produrre range di valori attesi propri basati sulla popolazione indigena dove il laboratorio risiede.

10.1. Precisione*10.1.1. Intra - Assay*

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (10x) tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è $\leq 9\%$.

10.1.2. Inter - Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 10\%$.

10.2. Accuratezza

La prova di diluizione condotta su campioni ad alta concentrazione di 17β Estradiolo, ha dato un valore di recupero medio (\pm SD) di $95,69\% \pm 7,74\%$.

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 120 - 240 - 480 - 960 pg/mL di 17β Estradiolo, ha dato un valore medio (\pm SD) di $101,09\% \pm 5,42\%$.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di 17β Estradiolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 8,68 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate al 50% secondo Abraham:

17 β Estradiol	100 %
Estrone	2 %
Estriol	0.39 %
Testosterone	0.02 %
Cortisol	$< 7 \times 10^{-3}\%$
Progesterone	$< 3 \times 10^{-4}\%$
Dhea-s	$< 1 \times 10^{-4}\%$

10.5. Correlazione con kit commerciale

Il kit Diametra Estradiol ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 16 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$(17\beta\text{-Estradiolo Dia}) = 1,03 * (17\beta\text{-Estradiolo Ref}) - 12,96$$

$$r^2 = 0,996$$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali.

BIBLIOGRAFIA

- Joshi, U.M., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- D.Exley and R. Abuknesha Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
- Ismail A.A, et al J.Clin.Endocrin.Metab. 34,177-184 (1972)
- Rajkowski, K.M, et al Steroids 29-5 (1977)
- Wisdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
- D. Sadem, et al J. of Immunolog. Methods 28 125-131(1979)

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM003-11
Ed. 01/2015

ESTRADIOL ELISA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of 17 β -Estradiol in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ test

REF DKO003

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of 17 β -Estradiol concentration in human serum or plasma.

Estradiol ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Estradiol (17 β -Estradiol) is a sex hormone. It represents the major estrogen in humans. Estradiol has not only a critical impact on reproductive and sexual functioning, but also affects other organs including bone structure. During the reproductive years most Estradiol in women is produced by the ovaries, smaller amounts of Estradiol are also produced by the adrenal cortex. In men, the testes produce Estradiol. In plasma Estradiol is largely bound to sex hormone binding globulin (SHBG), also to albumin, only a fraction is free and biologically active. Serum Estradiol measurement in women reflect primarily the activity of the ovaries. During pregnancy estrogen levels, including Estradiol, rise steadily towards term. Estradiol increases due to placental production. In adult premenopausal women, ovarian production of Estradiol is stimulated by luteinizing hormone (LH) and the follicle-stimulating hormone (FSH) during the menstrual cycle.

In adult women, Estradiol levels are measured in the evaluation of fertility and menstrual irregularities, and to monitor ovarian follicular function during induction of ovulation. In the female, Estradiol acts as a growth hormone for tissue of the reproductive organs. The development of secondary sexual characteristics in women is driven by Estradiol. Estradiol is involved also in man fertility. Estradiol regulates the bone maintenance. Post-menopause women experience an accelerated loss of bone mass due to a relative estrogen deficiency.

Estradiol affects the production of multiple proteins including lipoproteins, binding proteins, and proteins responsible for blood clotting. Estrogens have been found to have neuroprotective function. The Estradiol, for his activities, is involved in some types of cancer such as breast cancer and cancer of the uterine lining. In addition there are several benign gynecologic conditions that are dependent on

estrogen such as endometriosis, leiomyomata uteri, and uterine bleeding.

2. PRINCIPLE

17 β -Estradiol (antigen) in the sample competes with the antigenic 17 β -Estradiol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti 17 β -Estradiol coated on the microplate (solid phase).

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17 β -Estradiol concentration in the sample.

17 β -Estradiol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagent and material supplied in the kit

1. Calibrators (6 vial)

CAL0 (1 mL)	REF DCE002/0306-0
CAL1 (0.5 mL)	REF DCE002/0307-0
CAL2 (0.5 mL)	REF DCE002/0308-0
CAL3 (0.5 mL)	REF DCE002/0309-0
CAL4 (0.5 mL)	REF DCE002/0310-0
CAL5 (0.5 mL)	REF DCE002/0311-0

2. Control (1 vial, 0.5 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0303-0

3. Conjugate (1 vial, 22 mL)

17 β -Estradiol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/0302-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Anti 17 β -Estradiol antibodies adsorbed on microplate

REF DCE002/0303-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4 **REF** DCE054-0

3.2. Reagents necessary not supplied in the kit

Distilled water

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

Store all reagents between 2÷8 °C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable until expiry date of the kit.

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of 17β-Estradiol from 20 pg/mL to 2000 pg/mL.
- The clinical significance of 17β-Estradiol determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.

- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₅)

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of 17β-Estradiol:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the standards are stable six months at 2÷8 °C.

6.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently, for 5 minutes, with a rotating mixer.

Once opened, it is stable six months at 2÷8 °C

6.3. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial "Conc. Wash Solution 10X" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8 °C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals, for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

6.4. Preparation of the sample

The determination of 17 β -Estradiol can be performed in human serum or plasma. Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. Before using, mix gently, for 5 minutes, with a rotating mixer. The Control is ready for use.

6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 μ L		
Sample/ Control		25 μ L	
Conjugate	200 μ L	200 μ L	
Incubate 2 h at +37°C. Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 μ L of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubate at room temperature (22 \div 28°C) for 30 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Shake gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Estradiol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the calibration curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of results

Interpolate the values of the samples on the calibration curve to obtain the corresponding values of the concentrations expressed in pg/mL.

9. REFERENCE VALUES

The serum 17 β -Estradiol reference values are:

		pg/mL
WOMEN	Follicular phase	30 – 100
	Ovulatory peak	130 – 350
	Luteinic phase	50 – 180
	Menopause	< 60
CHILDREN		< 40
MEN		< 60

Please pay attention to the fact that the determination of a range of expected values for a “normal” population in a given method is dependent on many factors, such as specificity and sensitivity of the method used and type of population under investigation. Therefore each laboratory should consider the range given by the Manufacturer as a general indication and produce their own range of expected values based on the indigenous population where the laboratory works.

10.1. Precision*10.1.1. Intra Assay Variation*

Within run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different human sera in one assay. The within assay variability is $\leq 9\%$.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements of three different human sera in different lots. The between assay variability is $\leq 10\%$.

10.2. Accuracy

The dilution test conducted with high concentration samples of 17β -Estradiol gave an average recovery value (\pm SD) of $95.69\% \pm 7.74\%$ with reference to the original concentrations.

The recovery of 120 – 240 – 480 – 960 pg/mL of 17β -Estradiol added to samples gave an average value (\pm SD) of $101.09\% \pm 5.42\%$ with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of 17β -Estradiol that can be distinguished from the calibrator zero is 8.68 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody calculated at 50% according to Abraham are shown in the table:

17 β Estradiol	100	%
Estrone	2	%
Estriol	0.39	%
Testosterone	0.02	%
Cortisol	$< 7 \times 10^{-3}$	%
Progesterone	$< 3 \times 10^{-4}$	%
Dhea-s	$< 1 \times 10^{-4}$	%

10.5. Correlation with a commercial kit

Diametra Estradiol ELISA kit was compared to another commercially available 17β -Estradiol assay. 16 serum samples were analysed in both test systems.

The linear regression curve is:

$$(17\beta\text{-Estradiol Dia}) = 1.03 \cdot (17\beta\text{-Estradiol Ref}) - 12.96$$

$$r^2 = 0.996$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

- Joshi, U.M., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- D.Exley and R. Abuknesha Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
- Ismail A.A, et al J.Clin.Endocrin.Metab. 34,177-184 (1972)
- Rajkowski, K.M, et al Steroids 29-5 (1977)
- Wisdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
- D. Sadem, et al J. of Immunolog. Methods 28 125-131(1979)

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354
Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM003-11
Ed. 01/2015

ESTRADIOL ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de 17 β Estradiol en suero o plasma humano

IVD



LOT
Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO003

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de 17 β Estradiol en suero y plasma.

El kit Estradiol ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El estradiol es una hormona sexual. Representa el estrógeno principal en los seres humanos. El estradiol afecta al funcionamiento reproductivo y sexual, e interfiere en otros órganos, incluida la estructura ósea. Durante los años fértiles, la mayor parte de estradiol en las mujeres se produce por los ovarios, y pequeñas cantidades se producen por la corteza suprarrenal. En los hombres, los testículos produce el estradiol. En el plasma el estradiol se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) y a la albúmina, sólo la fracción libre es biológicamente activa. La cantidad de estradiol en suero en mujeres refleja principalmente la actividad de los ovarios. Los niveles de estrógeno durante el embarazo aumentan en forma constante hasta el final del mismo. Los aumentos de los niveles de estradiol llevan a la síntesis de la placenta. En las mujeres con premenopausia, la producción ovárica de estradiol se estimula por la hormona luteinizante (LH) y por la hormona estimulante del folículo (FSH) durante el ciclo menstrual. En las mujeres, los niveles de estradiol miden la fertilidad y las irregularidades menstruales, y son necesarios para controlar el funcionamiento de los folículos ováricos durante la inducción de la ovulación. En las mujeres, el estradiol actúa como hormona para el desarrollo de los tejidos de los órganos reproductores.

El estradiol se ocupa del desarrollo de las características sexuales secundarias en las mujeres. El estradiol está involucrado en la fertilidad masculina.

El estradiol regula el mantenimiento de la masa ósea. Las mujeres con menopausia sufren una pérdida acelerada de la masa ósea debida a la falta de estrógenos. El estradiol afecta a la síntesis de las proteínas, como las lipoproteínas, las proteínas transportadoras y las proteínas responsables de la coagulación.

Los estrógenos tienen una función neuroprotectora. El estradiol se considera un oncogén, ya que está

involucrado en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el cáncer del revestimiento uterino. Además, existen distintas circunstancias ginecológicas benignas que dependen de los estrógenos, como por ejemplo la endometriosis.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El 17 β estradiol (antígeno) de la muestra compite con el el 17 β estradiol antigénico marcado con peroxidasa de rabano (HRP) por la unión al anticuerpo anti-17 β Estradiol adsorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación de las fracciones libre y unida se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por último, al reaccionar con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H₂SO₄).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de 17 β estradiol en la muestra. La concentración de 17 β estradiol en la muestra se calcula según una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 frascos)

CAL0 (1 mL)	REF DCE002/0306-0
CAL1 (0.5 mL)	REF DCE002/0307-0
CAL2 (0.5 mL)	REF DCE002/0308-0
CAL3 (0.5 mL)	REF DCE002/0309-0
CAL4 (0.5 mL)	REF DCE002/0310-0
CAL5 (0.5 mL)	REF DCE002/0311-0

2. Control (1 frasco, 0.5 mL)

La concentración del Control se indica en el certificado de calidad (Certificate of Analysis)

REF DCE045/0303-0

3. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

17 β Estradiol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti 17 β Estradiol absorbido en la microplaca

REF DCE002/0303-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂ -TMB (0,26 g/L) (*evítese el contacto con la piel*)
REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evítese el contacto con la piel*)
REF DCE005-0

7. Solución de lavado conc.10X (1 frasco, 50 mL)
Tampón fosfato 0,2M pH 7.4 **REF DCE054-0**

3.2 Reactivos necesarios no incluidos en el kit

Agua destilada

3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm).

Notas

Conservar los reactivos a oscuras, a temperatura entre 2 y 8 °C.

Atemperar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de 17β Estradiol desde 20 hasta 2000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de 17β Estradiol.

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.

- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8°C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.
- Antes del uso, esperar hasta que todos los componentes del kit y las muestras se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) y mezclar cuidadosamente.
- No mezclar componentes de kits de lotes distintos. Se debe observar la fecha de caducidad indicada en la etiqueta de la caja y de todas las ampollas. No usar componentes después de la fecha de caducidad.
- Si utiliza un equipo automático, es responsabilidad del usuario asegurar que el equipo ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los pocillos ELISA pueden causar una precisión pobre y/o un elevado fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en los sistemas automatizados, se recomienda aumentar el número de lavados.
- Para la reproducibilidad de los resultados, es importante que el tiempo de reacción sea igual para cada pocillo. El tiempo de dispensación de los pocillos no debe superar los 10 minutos; si se prolongara más allá de los 10 minutos, respétese el orden de dispensación. si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva de calibración en cada plato.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de interrupción. Tanto el sustrato como la solución de interrupción deben agregarse en la misma secuencia para evitar diferentes tiempos de reacción.
- Observar las directrices para la ejecución del control de calidad en los laboratorios clínicos al comprobar controles y/o pool de sueros.
- Observar la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de microplacas leen las DO verticalmente, por tanto no debe tocarse el fondo de los pocillos.

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Los Calibradores son listos para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos, los estándares permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2 Preparación del Conjugado

Casado listo para usar. Mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio.

Desde la apertura de la botella es estable 6 meses a 2 a 8°C.

6.3 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido del frasco de la "Solución de lavado conc. 10X" con agua destilada hasta un volumen de 500 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:10. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 mL teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.4 Preparación de la muestra

La determinación de 17b Estradiol se puede realizar en el plasma o suero humano. Si la dosis no se llevó a cabo el mismo día de la recolección, mantener la muestra a -20°C. Se recomienda no congelar y descongelar repetidamente las muestras. Antes de su uso, mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio. El Control está listo para usar.

6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C_0 - C_5), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C_0 - C_5	25 μ L		
Muestra/ Control		25 μ L	
Conjugado	200 μ L	200 μ L	
Incubar 2 h a 37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 μ L	100 μ L	100 μ L
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de 17b Estradiol para supervisar el rendimiento del análisis. Estas muestras deben tratarse como desconocidas y los valores deben determinarse en cada ensayo realizado. Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos adecuados para determinar las tendencias. El laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del análisis. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para evaluar la reproducibilidad. Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Una desviación significativa del rendimiento establecido puede indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

8. RESULTADOS

8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media (E_m) de cada punto de la curva de calibración (C_0-C_5) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C_0-C_5). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3 Cálculo de los resultados

Interpolar del gráfico los valores de absorbancia relativos a cada muestra y leer la concentración correspondiente en pg/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de 17 β Estradiol en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

		pg/mL
Mujeres	Fase folicular	30 – 100
	Pico Ovulatorio	130 – 350
	Fase Lutea	50 – 180
	Menopausia	< 60
Niños		< 40
Hombres		< 60

Es importante señalar que la determinación de un rango de valores esperados en un método dado para una población "normal" depende de muchos factores, tales como la especificidad y sensibilidad del método en uso, y la población en estudio. Por lo tanto, cada laboratorio debe considerar el intervalo especificado por el fabricante como una guía general y producir su propio rango de valores calculados en base al estadístico obtenido por el laboratorio, donde reside la población local.

10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

10.1 Precisión

10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (10x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 9.0%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 10%.

10.2 Exactitud

La prueba de dilución a cabo en muestras con altas concentraciones de estradiol, dio un valor de recuperación media (\pm SE) de 95,69% \pm 7,74%.

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 120 - 240 - 480 - 960 pg/mL de 17 β Estradiol ha dado un valor medio (\pm SE) de 101.09% \pm 5.42%.

10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de estradiol detectable que puede distinguirse del calibrador 0 es de 8,68 pg/mL con un límite de confianza del 95%..

10.4 Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas, calculadas al 50% según el método de Abraham:

17 Estradiol	100 %
Estrona	2 %
Estriol	0.39 %
Testosterona	0.02 %
Cortisol	< 7x10 ⁻³ %
Progesterona	< 3x10 ⁻⁴ %
Dhea-s	< 1x10 ⁻⁴ %

10.5 Correlación

El kit Diametra Estradiol ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de 17 β Estradiol. Se analizaron 16 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$y = 1.03 x - 12,96$$

$$r^2 = 0,996$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Eliminar los reactivos conforme con la normativa local sobre la materia.

BIBLIOGRAFÍA

- Joshi, U.M., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- D. Exley and R. Abuknesha Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
- Ismail A.A, et al J.Clin.Endocrin.Metab. 34,177-184 (1972)
- Rajkowski, K.M, et al Steroids 29-5 (1977)
- Wisdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
- D. Sadem, et al J. of Immunolog. Methods 28 125-131(1979)

Ed. 01/2015

DCM003-11

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

- mancata dispensazione del coniugato
- contaminazione del coniugato e/o del Substrato
- errori nell'esecuzione del saggio (es. Dispensazione accidentale dei reagenti in sequenza errata o provenienti da flaconi sbagliati, etc.)

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo breve, temperatura di incubazione troppa bassa

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

- coniugato non idoneo (es. non proveniente dal kit originale)
- tempo di incubazione troppo lungo, temperatura di incubazione troppa alta
- qualità scadente dell'acqua usata per la soluzione di lavaggio (basso grado di deionizzazione,)
- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

Valori inspiegabilmente fuori scala

- contaminazione di pipette, puntali o contenitori- lavaggi insufficienti (coniugato non completamente rimosso)

CV% intrasaggio elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperatura ambiente prima dell'uso
- il lavatore per micropiastre non lava correttamente (suggerimento: pulire la testa del lavatore)

CV% intersaggio elevato

- condizioni di incubazione non costanti (tempo o temperatura)
- controlli e campioni non dispensati allo stesso tempo (con gli stessi intervalli) (controllare la sequenza di dispensazione)
- variabilità intrinseca degli operatori

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

- no conjugate pipetted reaction after addition
- contamination of conjugates and/or of substrate
- errors in performing the assay procedure (e.g. accidental pipetting of reagents in a wrong sequence or from the wrong vial, etc.)

Too low reaction (too low ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too short, incubation temperature too low

Too high reaction (too high ODs)

- incorrect conjugate (e.g. not from original kit)
- incubation time too long, incubation temperature too high
- water quality for wash buffer insufficient (low grade of deionization)
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs