



DCM006-9
Ed. 01/2015

PROGESTERONE ELISA

per analisi di routine

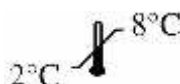
Determinazione immunoenzimatica diretta del Progesterone nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO006

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del Progesterone nel siero o plasma umano.

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

1. SIGNIFICATO CLINICO

Il progesterone (C21) è un ormone steroideo addetto al ciclo mestruale, alla gravidanza (sostegno alla gestazione) ed all'embriogenesi degli esseri umani e di altre specie. Il progesterone è importante per la sintesi dell'aldosterone (mineralcorticoide), e il 17-OHprogesterone per il cortisolo (glucocorticoide). I livelli del progesterone sono relativamente bassi nei bambini e nelle donne in postmenopausa. I maschi adulti hanno livelli simili a quelli delle donne durante la fase follicolare del ciclo mestruale. Nelle donne, i livelli del progesterone sono relativamente bassi durante la fase preovulatoria del ciclo mestruale, aumentano dopo ovulazione e sono elevati durante la fase luteale. In caso di gravidanza, i livelli del progesterone sono simili ai livelli luteali. Dopo il parto e durante la lattazione, i livelli del progesterone sono molto bassi. La caduta nei livelli di progesterone che seguono il parto è uno degli inneschi per produzione di latte. Il progesterone è prodotto nelle ghiandole adrenali, nelle gonadi (specificamente dopo ovulazione nel corpus luteum), nel cervello e, durante la gravidanza, nella placenta. Il progesterone è necessario per la "conversione" dell'endometrio in fase secretiva per preparare l'utero per impianto. Se la gravidanza non accade, i livelli del progesterone diminuiranno, conducendo, nell'essere umano, al periodo mestruale. Il progesterone appartiene al gruppo dei neurosteroidi, presenti in determinate zone nel cervello. Il progesterone è coinvolto nel funzionamento sinaptico, ha effetti neuroprotettivi ed interessa il processo di mielinizzazione.

Il progesterone ha numerosi effetti anche fuori dal sistema riproduttivo. Il progesterone è termogenico, riduce lo spasmo e distende il muscolo liscio. I bronchi sono dilatati e viene regolata la secrezione di muco. Il progesterone è un agente antinfiammatorio e regola la risposta immunitaria. È coinvolto nella funzione della tiroide, nell'osteogenesi.

La misura delle concentrazioni di progesterone nel siero è usata nella valutazione della funzione ovarica.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il Progesterone (antigene) presente nel campione compete con il Progesterone antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti Progesterone 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 (H_2O_2) ed il TMB Substrate, sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution (H_2SO_4). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del Progesterone presente nel campione.

La concentrazione di progesterone 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 (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/0606-0
CAL1	REF DCE002/0607-0
CAL2	REF DCE002/0608-0
CAL3	REF DCE002/0609-0
CAL4	REF DCE002/0610-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/0603-0

3. Coniugate (1 flacone, 22 mL)

Progesterone coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/0602-0

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Progesterone adsorbito su micropiastra

REF DCE002/0603-0

5. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -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 mol/L (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 2-8°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 Progesterone da 0,2 ng/mL a 40,0 ng/mL.
- Per concentrazioni superiori (ad es. gravidanza) si consiglia di diluire il campione; considerare il fattore di diluizione nel calcolo finale della concentrazione.
- La somministrazione di cortisone e di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Progesterone.

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°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°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...C₄)

Prima dell'uso lasciare almeno 5 minuti su agitatore rotante.

I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0,2	1,0	8,0	40,0

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Una volta aperti sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

6.2. Preparazione del campione

La determinazione del Progesterone può essere effettuata su plasma o siero 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. Il Controllo è pronto all'uso.

6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni flacone di "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 2-8°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. 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 essiccante 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-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	20 µL		
Campione /Controllo		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione e lavare i pozzetti 3 volte con 300 µL 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 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce.			

Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
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 Progesterone 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 o nella degradazione sperimentali 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-C₄) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C₀-C₄) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calcolo dei risultati

Interpolare i risultati sul grafico, leggendo i valori di concentrazione in ng/mL corrispondenti alle assorbanze di ciascun campione sulla curva disegnata.

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni sieriche o plasmatiche di Progesterone sono comprese nei seguenti intervalli:

		ng/mL	
UOMINI		< 1,0	
DONNE	fase follicolare	0,1 - 1,4	
	fase medioluteinica	4,0 - 25,0	
	menopause	< 1,0	
	gravidanza	Settimane	
		18 - 21	53 - 76
		22 - 25	60 - 86
		26 - 29	71 - 133
30 - 33		86 - 142	
34 - 37	104 - 175		
38 - 41	117 - 187		

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. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 4%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 9,3%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 1,0 - 2,0 - 4,0 - 8,0 ng/mL di Progesterone, ha dato un valore medio (\pm SD) di 100,88% \pm 8,29%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Progesterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,05 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

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

Progesterone	100 %
Testosterone	0,37 %
17 α OH-progesterone	0,29 %
17 β Estradiolo	0,0013 %
Estrone	0,00053 %
Estriolo	< 0,0001 %
Cortisolo	< 0,0001 %

10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Progesterone ELISA Diametra è stato comparato con il kit Progesterone EIAGen Adaltis disponibile in commercio. Sono stati testati 31 campioni di siero. La curva di regressione è:
(Prog. Diametra) = 0,97*(Prog. Adaltis) + 0,04
 $r^2 = 0,887$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

BIBLIOGRAFIA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem.22 (8), 1255 (1976)
2. De Villa, G.O., et al J. Clin: Endoc. Metab.35, 458 (1972)
3. Joyce,B.G., et al Steroids 29, no 6, 761, (1977)
4. Winkel P., et al Clin. Chem. 22 (4), 422 (1976)
5. Rajkowski K.N, et al Steroids 29, no 5 (1977)

Ed. 01/2015

DCM006-9

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



DCM006-9
Ed. 01/2015

PROGESTERONE ELISA

for routine analysis

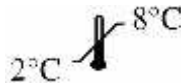
Direct immunoenzymatic determination of Progesterone in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$ tests

REF DKO006

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Progesterone concentration in human serum or plasma.

Progesterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Progesterone is a C-21 steroid hormone involved in the female menstrual cycle, pregnancy (supports *gestation*) and embryogenesis of humans and other species. Progesterone is the major naturally occurring human progestagen.

Progesterone is important for aldosterone (mineralocorticoid) synthesis, as 17-hydroxyprogesterone is for cortisol (glucocorticoid).

Progesterone levels are relatively low in children and postmenopausal women. Adult males have levels similar to those in women during the follicular phase of the menstrual cycle.

In women, progesterone levels are relatively low during the preovulatory phase of the menstrual cycle, rise after ovulation, and are elevated during the luteal phase. If pregnancy occurs, progesterone levels are maintained at luteal levels initially. After delivery of the placenta and during lactation, progesterone levels are very low. The fall in progesterone levels following delivery is one of the triggers for milk production.

Progesterone is produced in the adrenal glands, the gonads (specifically after ovulation in the corpus luteum), the brain, and, during pregnancy, in the placenta.

Progesterone converts the endometrium to its secretory stage to prepare the uterus for implantation. If pregnancy does not occur, progesterone levels will decrease, leading, in the human, to menstruation.

Progesterone belongs to the group of neurosteroids that are found in high concentrations in certain areas in the brain and are synthesized there. Neurosteroids affect synaptic functioning, are neuroprotective, and affect myelination.

Progesterone has multiple effects outside of the reproductive system. Progesterone is thermogenic, it reduces spasm and relaxes smooth muscle. Bronchi are widened and mucus regulated. Progesterone acts as an antiinflammatory agent and regulates the immune response. Progesterone also assists in thyroid function, in bone building by osteoblasts.

Measurement of serum progesterone concentrations have been used in evaluating ovarian function.

2. PRINCIPLE

The Progesterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Progesterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Progesterone 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 (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Progesterone concentration of in the sample.

Progesterone concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/0606-0
CAL1	REF DCE002/0607-0
CAL2	REF DCE002/0608-0
CAL3	REF DCE002/0609-0
CAL4	REF DCE002/0610-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0603-0

3. Conjugate (1 vial, 22 mL)

Progesterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/0602-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Antibody anti Progesterone coated on the microplate

REF DCE002/0603-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (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

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm).

Note

Store all reagents between 20-8°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.
- This method allows the determination of Progesterone from 0.2 ng/mL to 40.0 ng/mL.
- For higher values, for example in pregnancy, dilute the sample; consider the diluting factor when calculating the final result.
- The clinical significance of the Progesterone 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 Calibrator (C₀...C₄)

Before using leave 5 minutes on a rotary shaker.

The Calibrators are ready to use and have the following concentrations of Progesterone:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0.2	1.0	8.0	40.0

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

6.2. Preparation of the Sample

The determination of Progesterone can be performed in human plasma as well as in serum.

Store reagent at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample connection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

The Control is ready for use.

6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "10X Conc. Wash Solution" 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 it

is possible to observe the presence of crystals. In this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals is observed. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer the crystals completely, then mix until the crystals are completely dissolved.

6.4. 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-C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₄	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL 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 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature 22±28°C for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
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 Progesterone 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-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C₀-C₄) 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 ng/mL.

9. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Progesterone reference values are:

		ng/mL	
MEN		< 1.0	
WOMEN	follicular phase	0.1 - 1.4	
	Midluteinic phase	4.0 - 25.0	
	menopause	< 1.0	
	pregnancy	Weeks	
		18-21	53-76
		22-25	60-86
		26-29	71-133
30-33		86-142	
34-37	104-175		
38-41	117-187		

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.

Ed. 01/2015

DCM006-9

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

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (20x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 4%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (10x) of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is 9.3%.

10.2. Accuracy

The recovery of 1.0 - 2.0 - 4.0 - 8.0 ng/mL of Progesterone added to sample gave an average value (\pm SD) of 100.88% \pm 8.29% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Progesterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.05 ng/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:

Progesterone	100 %
Testosterone	0,37 %
17 α OH-progesterone	0,29 %
17 β Estradiolo	0,0013 %
Estrone	0,00053 %
Estriolo	< 0,0001 %
Cortisolo	< 0,0001 %

10.5. Correlation with RIA

Diametra Progesterone ELISA kit was compared to Adaltis Progesterone EIAGen kit commercially available. 31 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$(\text{Progest. Diametra}) = 0.97 * (\text{Progest. Adaltis}) + 0.04$$

$$r^2 = 0.887$$

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem.22 (8), 1255 (1976)
2. De Villa, G.O., et al J. Clin: Endoc. Metab.35, 458 (1972)
3. Joyce,B.G., et al Steroids 29, no 6, 761, (1977)
4. Winkel P., et al Clin. Chem. 22 (4), 422 (1976)
5. Rajkowski K.N, et al Steroids 29, no 5 (1977)



DCM006-9
Ed. 01/2015

PROGESTERONE ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Progesterona en suero o plasma humano

IVD



Ver etiqueta externa

LOT



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO006

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico competitivo para la determinación cuantitativa de la concentración de Progesterona en suero y plasma.

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

1. IMPORTANCIA CLÍNICA

Progesterona (C21) es una hormona esteroide que participan en el ciclo menstrual, el embarazo (apoyo a la gestación) y la embriogénesis de los seres humanos y otras especies.

La progesterona es importante para la síntesis de aldosterona (mineralocorticoides), y el 17-OH progesterone para la síntesis de cortisol (glucocorticoides). Los niveles de progesterona son relativamente bajos en los niños y en mujeres posmenopáusicas. Los hombres adultos tienen niveles similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de progesterona son relativamente bajas durante la fase preovulatoria del ciclo menstrual, aumentan después de la ovulación y se elevan durante la fase lútea. En caso de embarazo, los niveles de progesterona son similares a los niveles en la fase lútea. Después del nacimiento y durante la lactancia, los niveles de progesterona son muy bajos. La caída en los niveles de progesterona después del parto es uno de los desencadenantes de la producción de leche.

La progesterona se produce en las glándulas suprarrenales, las gónadas (específicamente después de la ovulación en el cuerpo lúteo), en el cerebro y, durante el embarazo, en la placenta.

La progesterona es necesaria para la "conversión" del endometrio en la fase secretora para preparar el útero para su implantación. Si no ocurre el embarazo, los niveles de progesterona disminuyen dando lugar, en los seres humanos, el período menstrual.

La progesterona pertenece al grupo de neuroesteroides, que están presentes en ciertas áreas en el cerebro. La progesterona está implicada en la función sináptica, tiene efectos neuroprotectores y afecta el proceso de mielinización.

La progesterona tiene muchos efectos fuera del sistema reproductivo. Es termogénica, reduce los espasmos y relaja el músculo liso. Los bronquios se

dilatan y regula la secreción de moco. La progesterona es un agente anti-inflamatorio y regula la respuesta inmunitaria.

Está involucrada en la función tiroidea y en la osteogénesis.

La medición de las concentraciones de progesterona en el suero se utiliza en la evaluación de la función ovárica.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La Progesterona (antígeno) de la muestra compete con la Progesterona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-Progesterona 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 (H_2O_2) y el Substrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H_2SO_4). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Progesterona en la muestra. La concentración de Progesterona 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 (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0606-0
CAL1	REF DCE002/0607-0
CAL2	REF DCE002/0608-0
CAL3	REF DCE002/0609-0
CAL4	REF DCE002/0610-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/0603-0

3. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

Progesterona conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0602-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti Progesterona adsorbido en la microplaca

REF DCE002/0603-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
 H_2O_2 -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 Proclin 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 interrupción 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/ H_2O_2 a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de Progesterona desde 0.2 hasta 40 ng/mL.
- Para concentraciones más altas (por ejemplo, embarazo) se recomienda diluir la muestra.
- El suministro de cortisona y de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de Progesterona.

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)

Antes del uso mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio. Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de Progesterona:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
ng/mL	0	0.2	1	8	40

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos,

los Calibrador permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

6.2 Preparación de la muestra

La determinación de Progesterona 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.

El Control está listo para usar.

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 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 (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	20 µL		
Muestra/ Control		20 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	
Incubar 1 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.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
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 Progesterona 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 (C₀-C₄) y de cada muestra.

8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₄). 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 ng/mL.

9. VALORES DE REFERENCIA

Las concentraciones de Progesterona en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

		ng/mL	
HOMBRES		< 1,0	
MUJERES:	fase folicular	0,1 - 1,4	
	fase medio-lútea	4,0 - 25,0	
	menopausia	< 1,0	
	embarazo	semana	
		18 - 21	53 - 76
		22 - 25	60 - 86
		26 - 29	71 - 133
30 - 33		86 - 142	
34 - 37	104 - 175		
38 - 41	117 - 187		

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 (20x) dos niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 4%.

10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (10x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 9.3%.

10.2 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 1 - 2 - 4 - 8 ng/mL de Progesterona ha dado un valor medio (\pm SE) de 100.88% \pm 8.29%.

10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de Progesterona detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0.05 ng/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:

Progesterona	100 %
Testosterona	0,37 %
17 α OH-progesterona	0,29 %
17 β Estradiol	0,0013 %
Estrona	0,00053 %
Estriol	< 0,0001 %
Cortisol	< 0,0001 %

10.5 Correlación

El Progesterona ELISA Diametra fue comparado con otro ensayo comercial de Progesterona (Adaltis). Se analizaron 31 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$(\text{Diametra}) = 0.97 * (\text{Adaltis}) + 0.04$$

$$r^2 = 0,887$$

11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

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

BIBLIOGRAFÍA

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem.22 (8), 1255 (1976)
2. De Villa, G.O., et al J. Clin: Endoc. Metab.35, 458 (1972)
3. Joyce,B.G., et al Steroids 29, no 6, 761, (1977)
4. Winkel P., et al Clin. Chem. 22 (4), 422 (1976)
5. Rajkowski K.N, et al Steroids 29, no 5 (1977)

Ed. 01/2015

DCM006-9

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