



DCM007-10  
Ed. 01/2015

1111111111111111111111111111

1

# FREE ESTRIOLO ELISA

per analisi di routine

**Determinazione immunoenzimatica dell'Estriolo libero nel siero o plasma umano**

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO007

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'Estriolo libero nel siero o plasma umano.

Il kit Free Estriol ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'estriolo è uno dei tre estrogeni principali prodotti dal corpo umano. È prodotto soltanto durante la gravidanza dal feto.

Durante la gravidanza la produzione di estriolo dipende da un'unità materno-placentare-fetale intatta. La produzione Fetale-placentare di estriolo conduce ad un aumento progressivo nei livelli circolanti materni che raggiungono un picco al termine della gestazione, notevolmente superiore rispetto ai livelli delle non gravide. Nella circolazione materna, l'estriolo viene velocemente coniugato nel fegato ed escreto per via urinaria con un'emivita di ~20 minuti. Poiché la produzione normale dell'estriolo dipende da una circolazione materno-placentare-fetale intatta e da un metabolismo fetale funzionale, i livelli materni dell'estriolo sono usati per controllare la condizione fetale durante la gravidanza, specialmente durante il terzo trimestre.

Il DHEA prodotto dalla corteccia surrenale del feto, è convertito in estriolo dalla placentina.

Livelli anormalmente bassi in una donna incinta, possono indicare un problema nello sviluppo del bambino.

I livelli di estriolo in donne non gravide, in menopausa e negli uomini sono simili.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

L'estriolo libero (antigene) presente nel campione, compete con l'estriolo antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti estriolo 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il TMB-Substrate, sviluppando una

colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Estriolo libero presente nel campione.

La concentrazione di Estriolo libero nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

- Calibrators** (7 flaconi, 1 mL ciascuno)  
CAL0 **REF DCE002/0706-0**  
CAL1 **REF DCE002/0707-0**  
CAL2 **REF DCE002/0708-0**  
CAL3 **REF DCE002/0709-0**  
CAL4 **REF DCE002/0710-0**  
CAL5 **REF DCE002/0711-0**  
CAL6 **REF DCE002/0712-0**
- Control** (1 flacone, 1 mL)  
La concentrazione del Controllo è riportata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/0703-0**
- Conjugate** (1 flacone, 15 mL, pronto all'uso)  
Estriolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/0702-0**
- Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)  
Anticorpo anti Estriolo adsorbito su micropiastra **REF DCE002/0703-0**
- TMB Substrate** (1 flacone, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (*evitare il contatto con la pelle*) **REF DCE004-0**
- Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)  
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*) **REF DCE005-0**
- 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 e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Letture 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.
- Tutti i reattivi di origine umana usati nella preparazione dei reagenti sono stati testati e sono risultati negativi per la presenza di anticorpi anti-HIV 1&2, per HbsAg e per anticorpi anti-HCV. Tuttavia nessun test offre la certezza completa dell'assenza di HIV, HBV, HCV o di altri agenti infettivi. Pertanto, i reagenti devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Sodio Azide (NaN<sub>3</sub>) o di Proclin 300<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- La Sodio Azide può essere tossica se ingerita o assorbita attraverso la cute o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azidi metalliche potenzialmente esplosive. Se si usa un lavandino per eliminare i reagenti, lasciar scorrere grandi quantità di acqua per prevenire la formazione di azidi.
- 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Estriolo da 0,15 ng/mL a 40 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Estriolo.

## 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. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background.
- 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
ng/mL	0	0.15	0.75	2	5	15	40

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

### 6.2. Preparazione del campione

La determinazione dell'Estriolo può essere effettuata su plasma o su 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 fiala 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 dei cristalli.

### 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, due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

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 QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di estriolo 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni dei calibratori (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>)  
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 ng/mL.

## 9. VALORI ATTESI

47 campioni di donne sane non in gravidanza sono stati analizzati con il kit Diametra Free Estriol ELISA; i valori ottenuti sono:

N°	Mediana (Estriol)
47	0.08 ng/mL

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.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>6</sub>	25 µL		
Campione /Controllo		25 µL	
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a +37°C. Allontanare la miscela di reazione; lavare 6 volte aggiungendo in ogni pozzetto 300 µL di wash solution diluita. <b>Nota importante:</b> 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 invertita su fogli di carta assorbente.			
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

**10.1. Precisione***10.1.1. Intra-Assay*

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è 7,4%.

*10.1.2. Inter-Assay*

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 7,7%.

**10.2. Accuratezza**

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 0.51 - 1.02 - 2.03 - 4.07 - 8.13 ng/mL di Estriolo, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 96,96%  $\pm$  6,61%.

**10.3. Sensibilità**

La concentrazione minima di estriolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,03 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:

Free Estriolo	100 %
16 epi-estriolo	10,5 %
15 $\alpha$ OH-estriolo	7,0 %
Estriol 3 Solfato	2,0 %
Estradiolo	0,1 %
17 epi-estriolo	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 3 $\alpha$ -Glucuronato	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 16 $\alpha$ -Glucuronato	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estrone	$< 1 \times 10^{-4}$ %

**10.5. Correlazione**

Il kit Free Estriol ELISA (Diametra) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 80 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 0,90 x + 0,15$$

$$r^2 = 0,819$$

**11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO**

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

**BIBLIOGRAFIA**

1. Fischer - Rasmussen, W., et al Acta Obstet Gynecol. Scand. 60-417 - 420 (1981)
2. Truran, P.L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., et al J. Clin. Endoc. Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60, 187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

**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](mailto:info@diametra.com)



DCM007-10  
Ed. 01/2015

# FREE ESTRIOL ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Free Estriol in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO007

## INTENDED USE

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

Free Estriol ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Estriol (also oestriol) is one of the three main estrogens produced by the human body. It is only produced in significant amounts during pregnancy as it is made by the fetus.

During pregnancy the production of estriol depends on an intact maternal-placental-fetal unit. Fetal-placental production of estriol leads to a progressive rise in maternal circulating levels reaching a late-gestational peak several orders of magnitude greater than non-pregnant levels. In the maternal circulation, estriol undergoes rapid conjugation in the liver followed by urinary excretion with a half-life of ~20 minutes. Since normal estriol production depends on an intact maternal-placental-fetal circulation and functional fetal metabolism, maternal estriol levels have been used to monitor fetal status during pregnancy, particularly during the third trimester.

DHEA is produced by the adrenal cortex of the fetus, this is converted to estriol by the placenta.

If levels are abnormally low in a pregnant woman, this may indicate a problem with the development in the child. Levels of estriol in non-pregnant women do not change much after menopause, and levels are not significantly different from levels in men.

## 2. PRINCIPLE

The free estriol (antigen) in the sample competes with the antigenic estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti estriol 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 blue color that changes into yellow when the Stop Solution ( $H_2SO_4$ ) is added. The colour intensity is inversely proportional to the free estriol concentration of in the sample. Free Estriol

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 (7 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/0706-0
CAL1	REF DCE002/0707-0
CAL2	REF DCE002/0708-0
CAL3	REF DCE002/0709-0
CAL4	REF DCE002/0710-0
CAL5	REF DCE002/0711-0
CAL6	REF DCE002/0712-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

See concentration of Control on the Certificate of Analysis  
REF DCE045/0703-0

3. Conjugate (1 vial, 15 mL, ready to use)

Estriol conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)  
REF DCE002/0702-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Estriol antibody adsorbed on microplate  
REF DCE002/0703-0

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 the 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.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the reagents should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide or Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, allow scroll through large amounts of water to prevent azide build-up.
- 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Free Estriol from 0.15 ng/mL to 40 ng/mL.
- The clinical significance of Free Estriol determination can be invalidated if the patient was treated with natural or syntetic 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 lipemeic 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of Estriol:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
ng/mL	0	0.15	0.75	2	5	15	40

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 Estriol can be performed in human plasma as well as in serum.

Store samples 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 Wash Solution

Dilute the contents of each vial of "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 is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals; for greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care to transfer completely the crystals, then mix until 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>6</sub>	25 µL		
Sample/ Control		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at 37°C for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 6 times with 300 µL of diluted wash Solution. <b>Important note:</b> 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.			
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 the microplate gently. 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 Estriol 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 (E<sub>m</sub>) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (E<sub>m</sub>) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) 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. EXPECTED VALUES

47 samples from not pregnancy women were assayed with Diametra Free Estriol ELISA kit; the median of the values is:

N°	Median (Estriol)
47	0.08 ng/mL

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. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurements (20x) of three different sera in one assay. The within assay variability is 7.4%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurements (10x) of three different sera in different lots of kit. The between assay variability is 7.7%.

### 10.2. Accuracy

The recovery of 0.51 - 1.02 - 2.03 - 4.07 - 8.13 ng/mL of Estriol added to a sample gave an average value (±SD) of 96.96% ± 6.61% with reference to the original concentrations.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of free estriol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.03 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:

Free Estriol	100 %
16 epi-estriol	10.5 %
15 $\alpha$ OH-estriol	7.0 %
Estriol 3 Sulphate	2.0 %
Estradiol	0.1 %
17 epi-estriol	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 3 $\alpha$ -Glucuronate	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 16 $\alpha$ -Glucuronate	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estrone	$< 1 \times 10^{-4}$ %

### 10.5. Correlation

Diametra Free Estriol ELISA was compared to another commercially available Free Estriol assay. 80 serum samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.90 x + 0.15$$

$$r^2 = 0.819$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

## BIBLIOGRAPHY

1. Fischer - Rasmussen, W., et al Acta Obstet Gynecol. Scand. 60-417 - 420 (1981)
2. Truran, P.L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., et al J. Clin. Endoc. Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60, 187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015

DCM007-10

**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](mailto:info@diametra.com)





DCM007-10

Ed. 01/2015

# FREE ESTRIOL ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de estriol libre en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO007

## USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de estriol libre en suero o plasma humano.

El kit Free Estriol ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El estriol es uno de los tres estrógenos principales producidos por el cuerpo humano. Se produce solo por el feto durante el embarazo.

Durante el embarazo, la producción de estriol depende de una unidad materno-placentaria-fetal intacta. La producción fetal-placentaria de estriol lleva a un aumento progresivo en los niveles circulantes maternos que alcanzan un pico al final de la gestación, notablemente superior con respecto a los niveles de las no embarazadas. En la circulación materna, el estriol se conjuga rápidamente en el hígado y se excreta por vía urinaria, con una vida media de ~20 minutos. Puesto que la producción normal de estriol depende de una circulación materno-placentaria-fetal intacta y de un metabolismo fetal funcional, los niveles maternos de estriol se usan para controlar la condición fetal durante el embarazo, especialmente durante el tercer trimestre. La DHEA es producida por la corteza suprarrenal del feto y se convierte en estriol por la placenta.

Unos niveles anormalmente bajos en una mujer embarazada pueden indicar un problema en el desarrollo del niño.

Los niveles de estriol en mujeres no embarazadas, con menopausia y en hombres son similares.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El estriol libre (antígeno) de la muestra compete con el estriol antigénico marcado con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti estriol 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el Sustrato TMB, la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

### 3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (7 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/0706-0
CAL1	REF DCE002/0707-0
CAL2	REF DCE002/0708-0
CAL3	REF DCE002/0709-0
CAL4	REF DCE002/0710-0
CAL5	REF DCE002/0711-0
CAL6	REF DCE002/0712-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/0703-0

3. Conjugado (1 frasco, 15 mL, listos para usar)

Estriol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0702-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca)

Anticuerpo anti estriol absorbido en la microplaca

REF DCE002/0703-0

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 suministrados en el kit

Agua destilada.

### 3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

## Nota

Conservar todos los reactivos a 2-8°C, protegidos de la luz.

Abrir la bolsa del reactivo 4 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a 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.
- Todos los reactivos de origen humano usados en la preparación de los reactivos se han comprobado y han resultado negativos para la presencia de anticuerpos anti-VIH, para HbsAg y para anticuerpos anti-VHC. Sin embargo, ningún ensayo ofrece seguridad absoluta de la ausencia de VIH, VHB, VHC o de otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los reactivos deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio o Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o de los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre formando azidas metálicas potencialmente explosivas. Dejar que corra gran cantidad de agua, si se usa un lavabo para eliminar los reactivos, para prevenir la formación de azidas.
- 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de estriol de 0,15 ng/mL a 40 ng/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles eméticos de estriol.

## 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones de estriol:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>
ng/mL	0	0.15	0.75	2	5	15	40

Los Calibradores son estables hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta. Una vez abiertos se mantienen estables durante 6 meses a 2-8°C.

## 6.2. Preparación de la muestra

La determinación de estriol puede realizarse en plasma o suero humano.

Si la dosificación no se realiza el mismo día de la extracción, conservar la muestra a  $-20^{\circ}\text{C}$ . 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  $2\pm 8^{\circ}\text{C}$  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 ( $22\text{-}28^{\circ}\text{C}$ ) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$  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  $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ .
- 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 ( $C_0\text{-}C_6$ ), dos para el control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador $C_0\text{-}C_6$	25 $\mu\text{L}$		
Muestra/ Control		25 $\mu\text{L}$	
Conjugado	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	
<p>Incubar 1 h a <math>+37^{\circ}\text{C}</math>. Retirar la mezcla de reacción, lavar 6 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida.</p> <p><b>Nota importante:</b> 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.</p>			

Substrato TMB	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
Incubar 15 minutos a temperatura ambiente ( $22\pm 28^{\circ}\text{C}$ ), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
<p>Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.</p>			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de estriol 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 ( $C_0\text{-}C_6$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores ( $C_0\text{-}C_6$ )  
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 ESPERADOS

47 muestras de mujeres sanas no embarazadas fueron analizadas con el kit Diametra Free Estriol ELISA; los valores obtenidos son:

N°	Mediana (Estriol)
47	0.08 ng/mL

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. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

### 10.1. Precisión

#### 10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros distintos. La variabilidad intraensayo es 7,4%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 7,7%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 0,51 - 1,02 - 2,03 - 4,07 - 8,13 ng/mL de estriol ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 96,96%  $\pm$  6,61%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de estriol que puede distinguirse de Calibrador 0 es de 0,03 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.4. Especificidad

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

Estriol libre	100 %
16-epiestriol	10,5 %
15 $\alpha$ OH-estriol	7,0 %
Estriol 3 sulfato	2,0 %
Estradiol	0,1 %
17-epiestriol	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 3 $\alpha$ -glucurónido	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estriol 16 $\alpha$ -glucurónido	$< 1 \times 10^{-2}$ %
Estrona	$< 1 \times 10^{-4}$ %

### 10.5. Correlación con la dosis RIA

El kit Diametra Free Estriol ELISA se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 80 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$y = 0,90 x + 0,15$$

$$r^2 = 0,819$$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fischer - Rasmussen, W., et al Acta Obstet Gynecol. Scand. 60-417 - 420 (1981)
2. Truran, P.L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)
3. Vining, R. F., et al J. Clin. Endoc. Metab. 56, 454 (1983)
4. Bagger, P. V., et al Acta Obstet Gynecol Scand 60, 187 (1981)
5. Osterman, T. M., et al Clin. Chem. 25 (5) 716 (1979)
6. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

Ed. 01/2015

DCM007-10

**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](mailto: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	<b>LOT</b>	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	<b>CONT</b>	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	<b>REF</b>	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