

Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Estriol total ELISA

Enzyme Immunoassay for the quantitative determination of total estriol in human serum and plasma.



DE3717



96

**Please use only the valid version of the package insert provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Arbeitsanleitung.
Si prega di usare la versione valida dell'inserto del pacco a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti / Tabla de Contenidos

| | | |
|----|--|----|
| 1 | INTENDED USE | 3 |
| 2 | PRINCIPLE | 3 |
| 3 | REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION | 3 |
| 4 | WARNINGS | 4 |
| 5 | PRECAUTIONS | 4 |
| 6 | PROCEDURE | 5 |
| 7 | QUALITY CONTROL | 6 |
| 8 | RESULTS | 6 |
| 9 | REFERENCE VALUE | 6 |
| 10 | PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS | 7 |
| 11 | WASTE MANAGEMENT | 7 |
| 12 | BIBLIOGRAPHY | 7 |
| 13 | TROUBLESHOOTING | 8 |
| | | |
| 1 | DESTINAZIONE D'USO | 9 |
| 2 | PRINCIPIO DEL METODO | 9 |
| 3 | REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE | 9 |
| 4 | AVVERTENZE | 10 |
| 5 | PRECAUZIONI | 10 |
| 6 | PROCEDIMENTO | 11 |
| 7 | CONTROLLO QUALITA' | 12 |
| 8 | RISULTATI | 12 |
| 9 | VALORI DI RIFERIMENTO | 13 |
| 10 | PARAMETRI CARATTERISTICI | 14 |
| 11 | DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO | 14 |
| 12 | BIBLIOGRAFIA | 14 |
| 13 | SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI | 15 |
| | | |
| | SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS | 16 |

1 INTENDED USE

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

Total Estriol kit is intended for laboratory use only.

1.1 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

Total 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 (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution is added.

The colour intensity is inversely proportional to the Total Estriol concentration in the sample.

Total Estriol concentration in the sample is calculated based on a series of standards.

3 REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. Total Estriol **Standards** (4 vials, 1 mL each)
2. Total Estriol **Control** (1 vial, 1 mL)
Concentration of control is Lot-specific and is indicated on Quality Control Report
3. **Incubation Buffer** (1 vial, 30 mL)
Phosphate buffer 50 mM pH 7.5; BSA 1 g/L, stabilisers
4. **Enzyme Conjugate** (1 vial, 1 mL)
Estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
5. **Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Anti-Estriol antibody adsorbed on microplate
6. **TMB Substrate Solution** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂.TMB 0.26 g/L, (avoid any skin contact)
7. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Acidic solution 0.3 N, (avoid any skin contact)

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplate reader (450 nm)

Note

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

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close immediately after use.

Do not remove the adhesive sheet from the unused strips.

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 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 acidic solution. Acidic solution is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Total Estriol from 2 ng/mL to 200 ng/mL.
- The clinical significance of 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 °C - 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 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials 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.
- 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 Standard (S₁,S₂,S₃,S₄)

Before using, mix for 2 minutes.

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

| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 2.0 | 20.0 | 80.0 | 200.0 |

Stable until the expiry date of the kit at 2 °C - 8 °C.

Once opened, the standards are stable for 6 months at 2 °C - 8 °C.

6.2 Preparation of diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL Conjugate (reagent 4) to 2.0 mL of Incubation Buffer (reagent 3).

Mix gently for 5 minutes, with a rotating mixer.

Stable for 3 hours at room temperature (22 °C – 28 °C).

6.3 Preparation of Sample

The determination of Total Estriol should be performed in human serum or plasma

Store samples at -20 °C if the determination is not performed on the same day of sample collection.

Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

The Control is ready for use.

6.4 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C – 28 °C).

Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2 °C - 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 B₀, two for each point of the calibration curve (S₁-S₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

| Reagent | B ₀ | Standard | Sample/ Control | Blank |
|--|----------------|----------|--------------------|--------|
| Incubation buffer | 20 µL | | | |
| Sample/Control | | | 20 µL | |
| Standard S ₁ -S ₄ | | 20 µL | | |
| Diluted conjugate | 200 µL | 200 µL | 200 µL | |
| Incubate at 37 °C for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 2 times with 300 µL of distilled water. | | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubate at 22 °C – 28 °C for 15 minutes in the dark. | | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Shake gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against Blank. | | | | |

7 QUALITY CONTROL

Each laboratory should assay controls at normal, high and low levels range of Total 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 standard 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 standard curve (S1-S4) and of each sample

8.2 Standard Curve

Plot the values of absorbance of the standards against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g: Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of Results

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

9 REFERENCE VALUE

Serum concentrations of Estriol are included in the following ranges:

| weeks | Median | Range (ng/mL) |
|-------|--------|---------------|
| 17° | 18.0 | (10 - 27) |
| 18° | 25.9 | (14 - 51) |
| 19° | 39.5 | (26 - 52) |
| 20° | 40.0 | (27 - 53) |
| 21° | 45.6 | (24 - 66) |
| 22° | 39.2 | (25 - 58) |
| 23° | 56.1 | (27 - 70) |
| 24° | 56.3 | (28 - 75) |
| 25° | 64.3 | (29 - 84) |
| 26° | 68 | (41 - 105) |
| 27° | 57.4 | (41 - 110) |
| 28° | 78.0 | (38 - 127) |
| 29° | 87 | (45 - 146) |
| 30° | 75 | (45 - 160) |
| 31° | 88.0 | (50 - 170) |
| 32° | 90.5 | (46 - 175) |
| 33° | 100 | (60 - 180) |
| 34° | 105.6 | (60- 190) |
| 35° | 114.2 | (65 - 200) |
| 36° | 126.0 | (74 - 210) |
| 37° | 177.0 | (90 - 234) |
| 38° | 190.0 | (101 - 288) |
| 39° | 190.0 | (102 - 306) |
| 40° | 180.0 | (60 - 325) |
| 41° | 177.5 | (95 - 280) |

10 PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1 Precision

10.1.1 Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate measurements (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is $\leq 9.7\%$.

10.1.2 Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different control sera in different kit lots. The between assay variability is $\leq 10\%$.

10.2 Accuracy

The recovery of 10 – 40 – 100 ng/mL of Total Estriol added to two samples gave an average value (\pm SD) of $94.88\% \pm 4.47\%$ with reference to the original concentrations.

10.3 Sensitivity

The lowest detectable concentration of Total Estriol that can be distinguished from the zero standard is 0.22 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:

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

10.5 Correlation with RIA

The total Estriol ELISA was compared to another commercially available Total Estriol assay. 32 serum samples were analysed.

The linear regression curve was calculated

$$y = 0.86x + 3.85$$

$$r^2 = 0.952$$

$$y = \text{Total Estriol ELISA (DE3717)}$$

$$x = \text{Total Estriol Adaltis RIA Kit}$$

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

12 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)

13 TROUBLESHOOTING

ERRORS / 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 CV%

- reagents and/or strips not pre-warmed to room temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)

too high between-run CV %

- incubation conditions not constant (time, temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

1 DESTINAZIONE D'USO

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

Il kit Total Estriol è destinato al solo uso di laboratorio.

1.1 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 placenta.

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 Totale (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene 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.

L'enzima presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution.

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione dell'estriolo totale presente nel campione.

La concentrazione di estriolo totale 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. Total Estriol **Standard** S1 – S4, (4 flaconi, 1 mL ciascuno)
2. Total Estriol **Control** (1 flacone, 1 mL)
La concentrazione del Controllo è Lotto-specifica ed è indicata sul Foglio di Controllo
3. **Incubation Buffer** (1 flacone, 30 mL)
Tampone fosfato 50 mM pH 7,5 - BSA 1 g/L, conservanti
4. **Enzyme Conjugate** (1 flacone, 1 mL)
Estriolo coniugato con perossidasi di rafano
5. **Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti estriolo adsorbito su micropiastra
6. **TMB-Substrate Solution** (1 flacone, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L), evitare il contatto con la pelle.
7. **Stop solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido soluzione 0.3 N, evitare il contatto con la pelle.

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm).

Note

Conservare tutti i reattivi a 2 °C - 8 °C al riparo dalla luce.

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare. Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica..

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 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 soluzione diluito. L'acido soluzione 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 dell'Estrilo Totale da 2 ng/mL a 200 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Estrilo.

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 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 degli Standard (S1 - S4)

Prima dell'uso agitare per 2 minuti.

Gli Standard sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni di Estriolo:

| | S ₁ | S ₂ | S ₃ | S ₄ |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| ng/mL | 2,0 | 20,0 | 80,0 | 200,0 |

Stabili fino alla scadenza del kit a 2 °C - 8 °C

Una volta aperti sono stabili per 6 mesi a 2 °C - 8 °C

6.2 Preparazione del Coniugato diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 10 µL di Conjugate (reattivo 4) a 2 mL di Incubation Buffer (reattivo 3).

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).

6.3 Preparazione del campione

La determinazione dell'Estriolo totale si effettua su siero o plasma umano.

Se il dosaggio non viene effettuato lo stesso giorno del prelievo conservare il campione a -20 °C.

Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

Il Controllo è pronto all'uso.

6.4 Procedimento

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C).
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2 °C - 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 il B₀, due per ogni punto della curva di calibrazione (S1-S4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

| Reagente | B ₀ | Standard | Campione /Controllo | Bianco |
|---|----------------|----------|---------------------|--------|
| Incubation buffer | 20 µL | | | |
| Campione/Controllo | | | 20 µL | |
| Standard S1-S4 | | 20 µL | | |
| Coniugato Diluito | 200 µL | 200 µL | 200 µL | |
| Incubare 1 h a +37 °C. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 2 volte con 0,3 mL di acqua distillata. | | | | |
| TMB Substrate | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22 °C – 28 °C), al riparo dalla luce. | | | | |
| Stop Solution | 100 µL | 100 µL | 100 µL | 100 µL |
| Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro il Bianco. | | | | |

7 CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Estriolo totale 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.

Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite possono indicare un inosservato cambio di condizioni sperimentali o una degradazione dei reagenti kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione delle variazioni.

8 RISULTATI

8.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) del B_0 , di ciascun punto della curva standard ($S_1 - S_4$) e di ogni campione.

8.2 Curva Standard

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione del B_0 e delle concentrazioni degli standard ($S_1 - S_4$). (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 DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni sieriche di Estriolo sono comprese nei seguenti intervalli:

| Settimane | Mediana | Range (ng/mL) |
|------------------|----------------|----------------------|
| 17° | 18,0 | (10 - 27) |
| 18° | 25,9 | (14 - 51) |
| 19° | 39,5 | (26 - 52) |
| 20° | 40,0 | (27 - 53) |
| 21° | 45,6 | (24 - 66) |
| 22° | 39,2 | (25 - 58) |
| 23° | 56,1 | (27 - 70) |
| 24° | 56,3 | (28 - 75) |
| 25° | 64,3 | (29 - 84) |
| 26° | 68,0 | (41 - 105) |
| 27° | 57,4 | (41 - 110) |
| 28° | 78,0 | (38 - 127) |
| 29° | 87,0 | (45 - 146) |
| 30° | 75,0 | (45 - 160) |
| 31° | 88,0 | (50 - 170) |
| 32° | 90,5 | (46 - 175) |
| 33° | 100,0 | (60 - 180) |
| 34° | 105,6 | (60 - 190) |
| 35° | 114,2 | (65 - 200) |
| 36° | 126,0 | (74 - 210) |
| 37° | 177,0 | (90 - 234) |
| 38° | 190,0 | (101 - 288) |
| 39° | 190,0 | (102 - 306) |
| 40° | 180,0 | (60 - 325) |
| 41° | 177,5 | (95 - 280) |

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 (16x) la misura di due differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è $\leq 9,7\%$.

10.1.2 Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (12x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è $\leq 10\%$.

10.2 Accuratezza

La prova di recupero condotta su due campioni arricchiti con 10 – 40 – 100 ng/mL di Estriolo, ha dato un valore medio (\pm SD) di $94,88\% \pm 4,47\%$

10.3 Sensibilità

La concentrazione minima di Estriolo totale misurabile che può essere distinta dal punto B0 è 0,22 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:

| | |
|-----------------------------------|------------------------|
| Estriol | 100 % |
| 16 epi-estriol | 10,5 % |
| 15 α OH-estriolo | 7,0 % |
| Estriol 3 Solfato | 2,0 % |
| Estradiolo | 0,1 % |
| 17 epi-estriol | $< 1 \times 10^{-2}\%$ |
| Estriol 3 α Glucuronate | $< 1 \times 10^{-2}\%$ |
| Estriol 16 α □ Glucuronate | $< 1 \times 10^{-2}\%$ |
| Estrone | $< 1 \times 10^{-4}\%$ |

10.5 Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Total Estriol (DE3717) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 32 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 0,86 x + 3,85$$

$$r^2 = 0,952$$

$$y = \text{Total Estriol ELISA (DE3717)}$$

$$x = \text{Totale Estriol Adaltis RIA Kit}$$

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

12 BIBLIOGRAFIA

Fischer-Rasmussen, W., et al Acta Obstet Gynecol. Scand. 60-417 - 420 (1981)

Truran, P.L., et al Clin. Chem. 28/12, 2393 (1982)

Vining, R. F., et al J. Clin. Endoc. Metab. 56, 454 (1983)

Bagger, P.V, et al Acta Obstet Gynecol Scand 60, 187 (1981)

Osterman, T.M, et al Clin. Chem. 25(5) 716 (1979)

Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22 (8) 1243-1255 (1976)

13 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

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% intra-assy elevato

- reagenti e/o strip non portate a temperature 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

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

| Symbol | English | Deutsch | Français | Español | Italiano |
|---|------------------------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|-------------------------------------|
|  | Consult instructions for use | Gebrauchsanweisung beachten | Consulter les instructions d'utilisation | Consulte las instrucciones de uso | Consultare le istruzioni per l'uso |
|  | European Conformity | CE-Konformitätskennzeichnung | Conformité aux normes européennes | Conformidad europea | Conformità europea |
|  | In vitro diagnostic device | In-vitro-Diagnostikum | Usage Diagnostic in vitro | Para uso Diagnóstico in vitro | Per uso Diagnostica in vitro |
|  | For research use only | Nur für Forschungszwecke | Seulement dans le cadre de recherches | Sólo para uso en investigación | Solo a scopo di ricerca |
|  | Catalogue number | Katalog-Nr. | Numéro de catalogue | Número de catálogo | Numero di Catalogo |
|  | Lot. No. / Batch code | Chargen-Nr. | Numéro de lot | Número de lote | Numero di lotto |
|  | Contains sufficient for <n> tests/ | Ausreichend für "n" Ansätze | Contenu suffisant pour "n" tests | Contenido suficiente para <n> ensayos | Contenuto sufficiente per "n" saggi |
|  | Storage Temperature | Lagerungstemperatur | Température de conservation | Temperatura de conservación | Temperatura di conservazione |
|  | Expiration Date | Mindesthaltbarkeitsdatum | Date limite d'utilisation | Fecha de caducidad | Data di scadenza |
|  | Legal Manufacturer | Hersteller | Fabricant | Fabricante | Fabbricante |
| Distributed by | Distributor | Vertreiber | Distributeur | Distribuidor | Distributore |
| Content | Content | Inhalt | Conditionnement | Contenido | Contenuto |
| Volume/No. | Volume / No. | Volumen/Anzahl | Volume/Quantité | Volumen/Número | Volume/Quantità |