



DCM001-12  
Ed. 11/2016

# CORTISOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Cortisolo nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO001

## DESTINAZIONE D'USO

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

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

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il cortisolo è un ormone steroideo liberato dalla corteccia surrenale in risposta all'ormone ACTH (prodotto dalla ghiandola pituitaria), esso è coinvolto nella risposta allo stress; aumenta la pressione sanguigna, glicemia, può causare la sterilità in donne e sopprime il sistema immunitario.

Il cortisolo agisce tramite i recettori intracellulari specifici ed ha effetti in numerosi sistemi fisiologici, compreso il sistema immunitario, la regolazione del glucosio, il tono vascolare, l'utilizzazione del substrato ed il metabolismo osseo. Il cortisolo è escreto soprattutto nelle urine in forma (libera) non legata.

Il cortisolo nel plasma è legato dalla globulina legante i corticosteroidi (CBG, transcortin) con alta affinità e dall'albumina. Soltanto il cortisolo libero è disponibile ai recettori.

La quantità di cortisolo presente nel siero subisce variazioni durante la giornata: sono presenti livelli elevati al mattino presto e livelli più bassi di sera, parecchie ore dopo l'inizio di sonno. I livelli elevati sono presenti circa tra le 6 e le 8 ed i più bassi livelli sono presenti intorno a mezzanotte. Le funzioni endogene normali sono la base per le conseguenze fisiologiche dello stress cronico - la secrezione prolungata del cortisolo causa lo sforzo del muscolo, iperglicemia e sopprime le risposte immuni/infiammatorie. Le stesse conseguenze risultano dall'uso prolungato di farmaci a base di glucocorticoidi.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il cortisolo (antigene) presente nel campione compete con il cortisolo antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-Cortisolo 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 (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del cortisolo presente nel campione.

La concentrazione di Cortisolo 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 DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

#### 2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi REF DCE045/0103-0

#### 3. Conjugate (1 flacone, 21 mL)

Cortisolo coniugato con Perossidasi di rafano (HRP) REF DCE002/0102-0

#### 4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpi anti Cortisolo adsorbiti sulla micropiastra REF DCE002/0103-0

#### 5. 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

#### 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 e strumentazione ausiliari

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.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 Cortisolo da 10 ng/mL a 500 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Cortisolo.

## 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	10	50	150	500

I Calibratori sono stabili fino alla data di scadenza riportata in etichetta. Dopo l'apertura dei flaconi sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

### 6.2. Preparazione del Coniugato

Coniugato pronto all'uso. Mescolare delicatamente per almeno 5 minuti su agitatore rotante. Dall'apertura del flacone è stabile 6 mesi a 2-8°C.

### 6.3. Preparazione del Campione

La determinazione del Cortisolo con questo kit 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.

### 6.4. 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.

#### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	20 µL		
Campione/Controllo		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubare 1 ora a 37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22÷28°C).			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la piastra. 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 Cortisolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato.

Occorrerebbe compilare delle tabelle di controllo di qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Si suggerisce di utilizzare metodi statistici adeguati per verificare 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. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con le prove precedenti. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento non osservato delle condizioni sperimentali o la degradazione dei reagenti del kit. In questo caso si consiglia di utilizzare reagenti freschi 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>4</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche o plasmatiche di Cortisolo sono comprese nei seguenti intervalli:

60 - 230 ng/mL prelievo effettuato tra le 8 e le 10 A.M.  
 30 - 150 ng/mL prelievo effettuato alle 4 P.M.

Pazienti trattati con ACTH: 280 - 600 ng/mL  
 Pazienti trattati con desametasone: 0 - 50 ng/mL

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è 5,1%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 11,0%.

### 10.2. Specificità: cross reagenti

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

Cross Reagent	% Cross Reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46,20 %
11-Deoxycortisol	4,00 %
Cortisone	3,69 %
Prednisone	3,10 %
Corticosterone	1,34 %
11 $\alpha$ OH Progesterone	1,00 %
Progesterone	< 0,01 %
Aldosterone	< 0,01 %
Pregnenolone	< 0,01 %
17 $\beta$ Estradiolo	< 0,01 %
Estrone 3-solfato	< 0,01 %
Estriolo	< 0,01 %
Testosterone	< 0,01 %
Spironolactone	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
Androstenedione	< 0,01 %
Androsterone	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Danazolo	< 0,01 %
Colesterolo	< 0,01 %
Desametasone	< 0,01 %

### 10.3. Specificità: sostanze interferenti

L'interferenza da Bilirubina, Emoglobina e Trigliceridi è stata testata con il kit Diametra Cortisol ELISA:

Sostanza	Conc. testata	Interferenza
Bilirubina	0,2 mg/mL	No
Emoglobina	2 mg/mL	No
Trigliceridi	6 mg/mL	No

Non è stata osservata interferenza con nessuna delle sostanze indagate; per le buone pratiche di laboratorio, si raccomanda comunque di non utilizzare campioni altamente lipemici o emolizzati.

### 10.4. Specificità: plasma e SST tube

È stata valutata l'interferenza in campioni plasmatici e in campioni ottenuti con SST (serum separation tube). Come riferimento è stato utilizzato siero ottenuto dal medesimo paziente.

Campione	Interferenza
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Litio-eparina plasma	No
Sodio-eparina plasma	No

Non sono state osservate interferenze.

### 10.5. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 15 - 35 - 70 ng/mL di Cortisolo, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 101,61%  $\pm$  4,42%.

La prova di diluizione condotta su 3 campioni di siero diluiti 2, 4, e 8 volte ha dato un valore medio di 106,18%  $\pm$  4,68%.

### 10.6. Sensibilità

La concentrazione minima di cortisolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 2,42 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.7. Correlazione

Il kit Cortisol ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio.

Sono stati testati 61 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,09 \cdot X - 19,23$$

$$r^2 = 0,904$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

- Foster, L. B. and Dunn, R.T.  
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
- De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.  
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
- Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R.  
Clin chim Acta 66 319 (1976)
- Kobayashi, Y., et al  
Steroids, 32 no. 1 (1978)
- Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A.  
Anal. Biochem. 97 248 (1979)

Ed. 11/2016

DCM001-12

**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)



DCM001-12  
Ed. 11/2016

# CORTISOL ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Cortisol in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO001

## INTENDED USE

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

Cortisol ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Cortisol is a steroid hormone released from the adrenal cortex in response to a hormone called ACTH (produced by the pituitary gland), it is involved in the response to stress; it increases blood pressure, blood sugar levels, may cause infertility in women, and suppresses the immune system.

Cortisol acts through specific intracellular receptors and has effects in numerous physiologic systems, including immune function, glucose-counter regulation, vascular tone, substrate utilization and bone metabolism. Cortisol is excreted primarily in urine in an unbound (free) form.

Cortisol is bound, in plasma, from corticosteroid-binding globulin (CBG, transcortin), with high affinity, and from albumin. Only free cortisol is available to most receptors.

The amount of cortisol present in the serum undergoes diurnal variation, with the highest levels present in the early morning, and lower levels in the evening, several hours after the onset of sleep. Highest levels are at about 6-8 a.m. and lowest levels are at about midnight. These normal endogenous functions are the basis for the physiological consequences of chronic stress - prolonged cortisol secretion causes muscle wastage, hyperglycaemia, and suppresses immune / inflammatory responses. The same consequences arise from long-term use of glucocorticoid drugs.

## 2. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Cortisol (antigen) in the sample competes with the antigenic Cortisol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti Cortisol 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

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

Cortisol 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 DCE002/0106-0

CAL1

REF DCE002/0107-0

CAL2

REF DCE002/0108-0

CAL3

REF DCE002/0109-0

CAL4

REF DCE002/0110-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

See Control concentration on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0103-0

3. Conjugate (1 vial, 21 mL)

Cortisol conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/0102-0

4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with anti Cortisol antibodies

REF DCE002/0103-0

5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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)

## Notes

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

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to 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.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. 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/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 Cortisol from 10 ng/mL to 500 ng/mL.
- The clinical significance of the Cortisol determination can be invalidated if the patient was treated with corticosteroids 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 Calibration (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration of Cortisol:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	10	50	150	500

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

### 6.2. Preparation of the conjugate

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

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

### 6.3. Preparation of the Sample

The determination of Cortisol with this kit can be performed in human plasma as well as in serum.

Store the sample 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.

### 6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content 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 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.

### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	20 µL		
Sample/ Control		20 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate 1 hour at 37°C. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22÷28°C).			
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 Cortisol 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</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. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Cortisol reference values are:

60 - 230 ng/mL between 8.00 – 10.00 A.M.  
 30 – 150 ng/mL at 4.00 P.M.

Patient treated with ACTH: 280 - 600 ng/mL  
 Patient treated with dexamethasone: 0 - 50 ng/mL

## 10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 10.1. Precision

#### 10.1.1. Intra Assay

Within run variation was determined by replicate (16x) the measurement of three different sera in one assay. The within assay variability is 5.1%.

#### 10.1.2. Inter Assay

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different sera in different lots. The between assay variability is 11.0%.

### 10.2. Specificity: cross reagents

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

Cross Reagent	% Cross Reactivity
Cortisol	100 %
Prednisolone	46.20 %
11-Deoxycortisol	4.00 %
Cortisone	3.69 %
Prednisone	3.10 %
Corticosterone	1.34 %
11 $\alpha$ OH Progesterone	1.00 %
Progesterone	< 0.01 %
Aldosterone	< 0.01 %
Pregnenolone	< 0.01 %
17b Estradiol	< 0.01 %
Estrone 3-solfato	< 0.01 %
Estriol	< 0.01 %
Testosterone	< 0.01 %
Spironolactone	< 0.01 %
DHEA	< 0.01 %
DHEA-S	< 0.01 %
Androstenedione	< 0.01 %
Androsterone	< 0.01 %
DHT	< 0.01 %
Danazol	< 0.01 %
Cholesterol	< 0.01 %
Dexamethasone	< 0.01 %

### 10.3. Specificity: interfering substances

Interference by Bilirubin, Hemoglobin and Triglycerides has been investigated in Diametra Cortisol ELISA kit:

Substance	Assayed Conc.	Interference
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Emoglobina	2 mg/mL	No
Trigliceridi	6 mg/mL	No

No interference has been observed with the substances under investigation; anyway, according to good laboratory practices, avoid to use highly lipemic or haemolysed samples.

### 10.4. Specificity: plasma and SST tube

Interference in plasma and SST (serum separation tube) samples has been evaluated. Serum obtained from the same patient has been used as reference.

Sample	Interference
SST (serum separation tube)	No
EDTA plasma	No
Litio-eparina plasma	No
Sodio-eparina plasma	No

No interference has been observed.

### 10.5. Accuracy

The recovery of 15 - 35 - 70 ng/mL of Cortisol added to samples gave an average value ( $\pm$ SD) of 101.61%  $\pm$  4.42% with reference to the original concentrations. The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 and 8 times gave an average value ( $\pm$ SD) of 106.18%  $\pm$  4.68%.

### 10.6. Sensitivity

The lowest detectable concentration of cortisol that can be distinguished from the Calibrator zero is 2.42 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.7. Correlation

Diametra Cortisol ELISA kit has been compared to a commercially available chemiluminescence Cortisol kit. 61 serum samples have been analysed. The linear regression curve has been calculated:  
 $Y = 1.09 \cdot X - 19.23$   
 $r^2 = 0.904$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T.  
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.  
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
3. Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R.  
Clin chim Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al  
Steroids, 32 no. 1 (1978)
5. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A.  
Anal. Biochem. 97 248 (1979)

Ed. 11/2016

DCM001-12

**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)





DCM001-12  
Ed. 11/2016

# CORTISOL ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Cortisol en suero o plasma humano

IVD



Ver etiqueta externa

LOT



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO001

## USO PREVISTO

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

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

## 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

El cortisol es una hormona esteroide liberada por la corteza suprarrenal en respuesta a la hormona ACTH (producida por la glándula pituitaria), está involucrado en la respuesta al estrés, aumenta la presión arterial, la azúcar en la sangre, puede causar infertilidad en las mujeres, y suprime el sistema inmunológico.

El cortisol actúa a través de receptores específicos intracelulares y tiene efectos en muchos sistemas fisiológicos, incluyendo el sistema inmune, regulación de la glucosa, el tono vascular, la utilización de sustratos y el metabolismo óseo. El cortisol se excreta principalmente en orina en su forma libre, no unida a proteína de transporte. El cortisol en el plasma se une a globulina transportadora de corticosteroides (CBG, transcortin) con gran afinidad y a la albumina. Sólo el cortisol libre está disponible para los receptores.

La cantidad de cortisol en el suero es sujeta a cambios durante el día: está presente en altos niveles en la mañana y los niveles más bajos por la noche, varias horas después del inicio del sueño. Los niveles más altos se alcanzan entre las 6:00 y 8:00 horas AM y los niveles más bajos alrededor de la medianoche. Las funciones endógenas normales son la base de las consecuencias fisiológicas del estrés crónico. La secreción prolongada de cortisol provoca esfuerzo muscular, hiperglucemia y suprime las respuestas inmunes/inflamatorias. Estas mismas consecuencias resultan del uso prolongado de fármacos basados en glucocorticoides.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El cortisol (antígeno) de la muestra compete con el cortisol antigénico marcado con peroxidasa de rabano (HRP) que es en el Conjugato por la unión al anticuerpo anti-cortisol 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 sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción ( $H_2SO_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Cortisol en la muestra.

La concentración de Cortisol 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 DCE002/0106-0
CAL1	REF DCE002/0107-0
CAL2	REF DCE002/0108-0
CAL3	REF DCE002/0109-0
CAL4	REF DCE002/0110-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/0103-0

3. Conjugado (1 frasco, 21 mL)

Cortisol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0102-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti cortisol adsorbido en la microplaca

REF DCE002/0103-0

5. Sustrato 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.

Llevar 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, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

#### 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.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de cortisol de 10 ng/mL hasta 500 ng/mL.
- La administración de esteroides naturales o sintéticos, pueden alterar los niveles de cortisol en sangre.

#### 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 la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada 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>4</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	10	50	150	500

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

##### 6.2. Preparación del Conjugado

Conjugado listo para usar. Mezclar suavemente durante 5 minutos en un agitador rotatorio. Desde la apertura de la botella es estable 6 meses a 2-8°C.

### 6.3. Preparación de la muestra

La determinación de cortisol 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.

### 6.4. 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

### 6.5. Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrad.	Muestra/ Control	Blanco
Calibradores C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	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. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, hacer 6 lavados.			
Substrato TMB	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 entre 5 minutos.			

### 7. CONTROL DE CALIDAD

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

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva de calibración ( $C_0-C_4$ ) y de cada muestra.

### 8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores ( $C_0-C_4$ ). 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 cortisol en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

60 - 230 ng/mL entre las 8:00 y 10:00 horas

30 - 150 ng/mL a las 16:00 horas

Pacientes tratados con ACTH: 280 - 600 ng/mL

Pacientes tratados con dexametazona: 0 - 50 ng/mL

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 10.1 Precisión

#### 10.1.1 Intra ensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de sueros. La variabilidad dentro del ensayo es 5,1%.

#### 10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (10x) tres niveles diferentes de suero con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 11,0%.

### 10.2 Especificidad: reactividad cruzada

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

Reactivo	Reactividad %
Cortisol	100 %
Prednisolona	46,20 %
11-Deoxycortisol	4,00 %
Cortisona	3,69 %
Prednisona	3,10 %
Corticosterone	1,34 %
11 $\alpha$ OH Progesterona	1,00 %
Progesterona	< 0,01 %
Aldosterona	< 0,01 %
Pregnenolona	< 0,01 %
17b Estradiol	< 0,01 %
Estrona 3-sulfato	< 0,01 %
Estriol	< 0,01 %
Testosterona	< 0,01 %

Spironolactona	< 0,01 %
DHEA	< 0,01 %
DHEA-S	< 0,01 %
Androstenediona	< 0,01 %
Androsterona	< 0,01 %
DHT	< 0,01 %
Danazol	< 0,01 %
Cholesterol	< 0,01 %
Desametasona	< 0,01 %

### 10.3 Especificidad: sustancias interferentes

Se investigó la interferencia de la Bilirrubina, Hemoglobina y Triglicéridos:

Sustancia	Concentración	Interferencia
Bilirrubina	0,2 mg/mL	No
Hemoglobina	2 mg/mL	No
Triglicéridos	6 mg/mL	No

Las sustancias investigadas no presentan interferencia con el Kit Diametra Cortisol ELISA; sin embargo para las buenas prácticas de laboratorio se recomienda no utilizar muestras altamente lipémicas o hemolizadas.

### 10.4 Especificidad: plasma y "SST Tube"

Se investigó si muestras plasmáticas o muestras obtenidas con "tubos separadores de suero" (SST Tube) presenten algún tipo de interferencia (como referencia se utilizó una muestra del mismo paciente).

Muestra	Interferencia
SST (tubos separadores de suero)	No
EDTA plasma	No
Litio-heparina plasma	No
Sodio-heparina plasma	No

El Kit Diametra Cortisol ELISA no presenta interferencia.

### 10.5 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 15 - 35 - 70 ng/mL de Cortisol ha dado un valor medio ( $\pm$ SE) de 101,61%  $\pm$  4,42%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2, 4 y 8 veces ha dado un valor medio ( $\pm$ SE) de 106,18%  $\pm$  4,68%.

### 10.6 Sensibilidad

La concentración mínima de Cortisol detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 2,42 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.7 Correlación

El kit Diametra Cortisol ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de Cortisol en quimioluminiscencia. Con ambos sistemas de prueba, se analizaron 61 muestras de suero.

Se calculó la curva de regresión lineal.

$$y = 1,09x - 19,23$$

$$r^2 = 0,904$$

### 11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

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

---

### BIBLIOGRAFÍA

1. Foster, L. B. and Dunn, R.T.  
Clin. Chem: 20/3, 365 (1974)
2. De Lacerda, L., Kowarski, A., and Migeon, C.J.  
J. Clin. Endocr. and Metab: 36, 227 (1973)
3. Rolleri, E., Zannino, M., Orlandini, S., Malvano, R.  
Clin chim Acta 66 319 (1976)
4. Kobayashi, Y., et al  
Steroids, 32 no. 1 (1978)
5. Arakawa, H., Maeda, M., Tsuji, A.  
Anal. Biochem. 97 248 (1979)

**Ed. 11/2016**

**DCM001-12**

**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)

	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





DCM002-12  
Ed. 07/2015

## TESTOSTERONE ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del Testosterone totale nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  tests

REF DKO002

### DESTINAZIONE D'USO

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

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

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il testosterone ( $17\beta$ -OH-4-androstene-3-one) è un ormone steroideo della famiglia degli androgeni prodotto principalmente dalle cellule di Leydig situate nei testicoli e, in minima parte, dalle ovaie e dalla corteccia surrenale. È presente anche nelle donne, che, rispetto agli uomini, hanno una maggiore tendenza a convertire quest'ormone in estrogeni.

In maschi postpuberali, il testosterone è secreto soprattutto dai testicoli e una parte deriva dalla conversione periferica del androstenedione. Nell'uomo è deputato allo sviluppo degli organi sessuali (differenziazione del testicolo e di tutto l'apparato genitale) e dei caratteri sessuali secondari, come la barba, la distribuzione dei peli, il timbro della voce e la muscolatura. Il testosterone, nell'età puberale, interviene anche sullo sviluppo scheletrico, limitando l'allungamento delle ossa lunghe ed evitando, in questo modo, una crescita spropositata degli arti. Nell'uomo adulto, i livelli di testosterone hanno un ruolo molto importante per quanto riguarda la sessualità, l'apparato muscolo scheletrico, la vitalità e la buona salute (intesa soprattutto come protezione da malattie metaboliche come ipertensione e diabete mellito); contribuisce a garantire la fertilità, in quanto stimola la maturazione degli spermatozoi nei testicoli. Inoltre influenza qualità e quantità dello sperma prodotto, poiché opera sulle vie seminali e sulla prostata, deputate alla produzione di sperma. La produzione giornaliera di testosterone nell'uomo varia dai 5 ai 7 milligrammi ma, superati i 30 anni, tende a diminuire annualmente dell'1%. Nelle donne più del 50% del testosterone sierico deriva dalla conversione periferica del androstenedione secreta dall'ovaia, e dalla secrezione diretta del testosterone da queste ghiandole. La maggior parte del testosterone circolante è legata alle SHBG e una piccola parte all'albumina. Soltanto una piccola parte (< 1%) circola come testosterone libero.

Gli effetti del testosterone possono essere classificati come effetti sessuali e anabolici, anche se la distinzione è in qualche modo artificiale. Gli effetti anabolici includono lo sviluppo della massa e resistenza del muscolo, densità e resistenza ossea e sviluppo e maturazione lineare dell'osso. Gli effetti sessuali includono la maturazione degli organi coinvolti e dopo la nascita (durante la pubertà) un abbassamento della voce, sviluppo della barba e peluria (caratteristiche sessuali secondarie maschili). I livelli del testosterone declinano gradualmente con l'età negli uomini (andropausa). I sintomi dell'andropausa sono generalmente associati all'invecchiamento quale la perdita della massa muscolare e diminuzione della densità ossea, diminuita resistenza fisica, diminuita capacità di memorizzazione e la perdita della libido.

In femmine di tutte le età, i livelli elevati di testosterone possono essere associati con tumori adrenali e ovaie policistiche.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel sangue il testosterone è legato alle SHBG (60%) ed in minore quantità ad altre proteine (ad esempio albumina); il testosterone non legato (< 1% del totale) è chiamato "testosterone libero". La formulazione chimica del presente dosaggio permette di liberare completamente il testosterone dalle proteine legate; pertanto il kit Diametra Testosterone permette di misurare la concentrazione del testosterone totale (legato + libero) presente nel campione. Se si vuole misurare solo la frazione di testosterone libero, è disponibile il kit ELISA Diametra "Free Testosterone". Il testosterone (antigene) presente nel campione compete con il testosterone antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) presente nel Coniugato nei confronti dell'anticorpo anti-Testosterone 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 (TMB), 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 di Testosterone presente nel campione.

La concentrazione di Testosterone 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	<b>REF</b> DCE002/0206-0
CAL1	<b>REF</b> DCE002/0207-0
CAL2	<b>REF</b> DCE002/0208-0
CAL3	<b>REF</b> DCE002/0209-0
CAL4	<b>REF</b> DCE002/0210-0

##### 2. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Control A	<b>REF</b> DCE045/0203A-0
Control B	<b>REF</b> DCE045/0203B-0

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

##### 3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Testosterone coniugato con Perossidasi di rafano (HRP)

**REF** DCE002/0202-0

##### 4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Testosterone adsorbito su micropiastra

**REF** DCE002/0203-0

##### 5. 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

##### 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 e materiali necessari non forniti

Acqua distillata

#### 3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

Lettore 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 strips 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 usare internamente né esternamente 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.

- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- 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 Testosterone da 0,2 ng/mL a 16,0 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Testosterone.

### 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. PROCEDURA

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	0,2	1,0	4,0	16,0

Una volta aperti, sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione del Coniugato

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

Stabile 6 mesi a 2÷8°C dall'apertura del flacone.

### 6.3. Preparazione dei Campioni

La determinazione del Testosterone 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. I Controlli sono pronti all'uso.

### 6.4. 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.

## 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Campione /Controllo		25 µL	
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a 37°C. Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza un lavatore automatico, effettuare 6 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 Testosterone 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 ( $E_m$ ) di ciascun punto della curva di calibrazione ( $C_0-C_4$ ) e di ogni campione.

### 8.2 Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie ( $E_m$ ) di ciascun Calibratore ( $C_0-C_4$ ) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3 Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche di Testosterone sono comprese nei seguenti intervalli:

	n° sieri	Mediana ng/mL	Range ng/mL
<b>Maschi (anni)</b>			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 1,01
12 - 18	16	5,02	0,56 - 8,63
19 - 55	16	3,54	2,12 - 6,01
> 55	16	1,51	0,11 - 7,25
<b>Femmine (anni)</b>			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 0,16
12 - 18	15	0,23	< 0,10 - 0,63
19 - 55	16	0,20	< 0,10 - 0,63
> 55	16	0,13	< 0,10 - 0,32

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 tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è  $\leq 7,0\%$ .

#### 10.1.2. Inter - Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (9x) la misura di tre differenti sieri con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è  $\leq 8,3\%$ .

### 10.2. Specificità

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

Testosterone	100%
Dihydrotestosterone	2,03%
Androstenedione	0,01%
Androsterone	0,05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0,01%
Cortisone	0%
17 $\beta$ Estradiol	0,16%
Prednisone	0%
Estrone	0,01%

### 10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione arricchito con 0,4 - 0,8 - 4,0 - 14,0 ng/mL di Testosterone, ha dato un valore medio di 98,9%.

La prova di diluizione effettuata su 3 campioni diluiti fino a 4 volte ha dato un valore medio di 99,7%.

### 10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di Testosterone misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,10 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.5. Correlazione

Il nuovo kit Testosterone ELISA Diametra è stato comparato con il precedente kit Testosterone ELISA Diametra. Sono stati testati i campioni di siero di 24 donne e 28 uomini.

La curva di regressione è:

$$Y = 1,13 \cdot X + 0,06$$

$$r^2 = 0,92$$

Il kit Testosterone Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 24 donne e 29 uomini.

La curva di regressione è:

$$Y = 0,89 \cdot X + 0,24$$

$$r^2 = 0,93$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## **BIBLIOGRAFIA**

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

**Ed. 07/2015**

**DCM002-12**

**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)



DCM002-12  
Ed. 07/2015

# TESTOSTERONE ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of total Testosterone in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO002

## INTENDED USE

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

Testosterone ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Testosterone (17β-OH-4-androstene-3-one) is a steroid hormone family of androgens mainly produced by the Leydig cells located in the testes and, minimally, by the ovaries and the adrenal cortex. It is also present in women who, compared to men, have a greater tendency to convert into estrogen this hormone.

In postpubertal males, testosterone is secreted primarily by the testes with only a small amount derived from peripheral conversion of androstenedione. In humans is deputy to the development of the sexual organs (differentiation of the testis and the whole genital apparatus) and of secondary sexual characteristics, such as beard, hair distribution, the timbre of the voice and muscles. The testosterone, during puberty, is also involved on skeletal development, limiting the elongation of the long bones and avoiding, in this way, a disproportionate growth of the limbs. In adult humans, the levels of testosterone have a very important role as regards the sexuality, the musculoskeletal system, the vitality and good health (mainly understood as protection from metabolic diseases such as hypertension and diabetes mellitus); helps to ensure fertility, as it stimulates the maturation of sperm in the testes. Also influence the quality and quantity of sperm produced, since the seminal work on the streets and on the prostate, deputies to the production of sperm. Daily production of testosterone in men varies from 5 to 7 milligrams, but exceeded 30 years, tends to decrease annually by 1%. In adult women over 50% of serum testosterone is derived from peripheral conversion of androstenedione secreted by the adrenal and ovary, with the remainder from direct secretion of testosterone by these glands. The majority of circulating testosterone is bound by SHBG and a smaller portion is bound by albumin. Only a small percentage (< 1%) exists in circulation as unbound or free testosterone.

Testosterone effects can be classified as virilizing and anabolic effects, although the distinction is somewhat artificial, as many of the effects can be considered both. Anabolic effects include growth of muscle mass and strength, increased bone density and strength, and stimulation of linear growth and bone maturation. Virilizing effects include maturation of the sex organs, and after birth (usually at puberty) a deepening of the voice, growth of the beard and axillary hair (male secondary sex characteristics).

Testosterone levels decline gradually with age in men (andropause). The signs and symptoms are non-specific, and are generally associated with aging such as loss of muscle mass and bone density, decreased physical endurance, decreased memory ability and loss of libido.

In females of all ages, elevated testosterone levels can be associated with a variety of virilizing conditions, including adrenal tumors and polycystic ovarian disease.

## 2. PRINCIPLE

Testosterone in the blood is bound to SHBG (60%) and in lower quantity to other proteins (for example albumin); the unbound Testosterone (< 1% of total Testosterone) is known as "free Testosterone". The chemical formulation of this assay allows to release completely the Testosterone from bound proteins; thus Diametra Testosterone kit allows to measure the concentration of total Testosterone (bound + free) in the sample. For the measurement of free Testosterone only, ELISA Diametra "Free Testosterone" kit is available.

Testosterone (antigen) in the sample competes with the antigenic Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP) present in the Conjugate for binding to the antibodies anti-testosterone coated on the microplates (solid phase). After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

The enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

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

Testosterone 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	<b>REF</b>	<b>DCE002/0206-0</b>
CAL1	<b>REF</b>	<b>DCE002/0207-0</b>
CAL2	<b>REF</b>	<b>DCE002/0208-0</b>
CAL3	<b>REF</b>	<b>DCE002/0209-0</b>
CAL4	<b>REF</b>	<b>DCE002/0210-0</b>

##### 2. Control (2 vials, 1 mL each)

Control A	<b>REF</b>	<b>DCE045/0203A-0</b>
Control B	<b>REF</b>	<b>DCE045/0203B-0</b>

Controls Concentration is indicated on the Certificate of Analysis

##### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Testosterone conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

**REF** **DCE002/0202-0**

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Testosterone antibody adsorbed on microplate

**REF** **DCE002/0203-0**

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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)

#### Notes

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

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate 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.
- 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.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as

healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.

- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) or Proclin 300<sup>R</sup> as preservatives. 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 Testosterone from 0.2 ng/mL to 16.0 ng/mL.
- The clinical significance of the determination Testosterone 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, it is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the

addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

The Calibrators are ready for use and have the following concentration of Testosterone:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	0.2	1.0	4.0	16.0

Once opened, the Calibrators are stable six months at 2-8°C.

### 6.2. Preparation of the Conjugate

Ready to use. Mix gently for 5 minutes with a rotating mixer.

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

### 6.3. Preparation of the Sample

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

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

The Controls are ready to use.

### 6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content 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 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.

### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.

- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		25 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Conjugate	100 µL	100 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. <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. <b>Automatic washer:</b> in case you use an automatic washer, it is advised to do 6 washing steps.			
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 Testosterone 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 absorbances ( $E_m$ ) for each point ( $C_0$ - $C_4$ ) of the calibration curve and of each sample.

### 8.2 Calibration curve

Plot the mean value of absorbance ( $E_m$ ) of the Calibrators ( $C_0$ - $C_4$ ) 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 Testosterone reference values are:

	n° sera	Median ng/mL	Range ng/mL
<b>Male (age)</b>			
< 12	16	< 0.10	< 0.10 - 1.01
12 - 18	16	5.02	0.56 - 8.63
19 - 55	16	3.54	2.12 - 6.01
> 55	16	1.51	0.11 - 7.25
<b>Female (age)</b>			
< 12	16	< 0.10	< 0.10 - 0.16
12 - 18	15	0.23	< 0.10 - 0.63
19 - 55	16	0.20	< 0.10 - 0.63
> 55	16	0.13	< 0.10 - 0.32

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 (16x) of three different sera in one assay. The within assay variability is  $\leq 7.0\%$ .

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurements (9x) of three different sera in different lots. The between assay variability is  $\leq 8.3\%$ .

### 10.2. Specificity

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

Testosterone	100%
Dihydrotestosterone	2.03%
Androstenedione	0.01%
Androsterone	0.05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0.01%
Cortisone	0%
17b Estradiol	0.16%
Estrone	0%
Prednisone	0.01%

### 10.3. Accuracy

The recovery of 0.4 - 0.8 - 4.0 - 14.0 ng/mL of Testosterone added to the sample gave an average value of 98.9% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 4 times gave an average value of 99.7%.

### 10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Testosterone that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.10 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.5. Correlation

The new Diametra Testosterone ELISA kit was compared to the old Diametra Testosterone ELISA kit. Serum samples from 24 females and 28 males were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 1.13 \cdot X + 0.06$$

$$r^2 = 0.92$$

Diametra Testosterone ELISA kit was compared to another commercially available Testosterone assay. Serum samples of 24 females and 29 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$Y = 0.89 \cdot X + 0.24$$

$$r^2 = 0.93$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## **BIBLIOGRAPHY**

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

**Ed. 07/2015**

**DCM002-12**

**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)



DCM002-12  
Ed. 07/2015

# TESTOSTERONE ELISA

para análisis de rutina

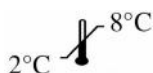
Determinación inmunoenzimática directa de Testosterone total en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO002

## USO PREVISTO

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

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

## 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La testosterona (17 $\beta$ -OH-4-androsteno-3-ona) es una hormona de la familia de los esteroides andrógenos producido principalmente por las células de Leydig localizadas en los testículos y, en pequeña parte, por los ovarios y la corteza adrenal. También está presente en las mujeres que, en comparación con los hombres, tienen una mayor tendencia a convertir esta hormona.

En los hombres después de la pubertad, la testosterona es secretada principalmente por los testículos y otra parte proviene de la conversión periférica de androstenediona.

En el hombre es diputado al desarrollo de los órganos sexuales (diferenciación testicular y todo el aparato genital) y de las características sexuales secundarias, como la barba, la distribución del vello, el timbre de la voz y los músculos. La testosterona, durante la pubertad, también interviene en el desarrollo esquelético, lo que limita el alargamiento de los huesos largos y evitar, de esta forma, un crecimiento desproporcionado de las extremidades. En los adultos, los niveles de testosterona tienen un papel muy importante en cuanto a la sexualidad, el sistema músculo-esquelético, la vitalidad y buena salud (entendida principalmente como protección contra las enfermedades metabólicas como la hipertensión y la diabetes mellitus); ayuda a asegurar la fertilidad, ya que estimula la maduración de espermatozoides en los testículos. Además, influyen en la calidad y cantidad de esperma producido, ya que el trabajo fundamental en las células y en la próstata, los diputados a la producción de esperma. La producción diaria de testosterona en los hombres varía de 5 a 7 miligramos, pero superó 30 años, tiende a disminuir anualmente por 1%.

En las mujeres más del 50% de la testosterona sérica se deriva de la conversión periférica de androstenediona ovario-secreta y de la secreción de testosterona directa por estas glándulas. La mayor

parte de la testosterona circulante se une a la SHBG y una pequeña parte a la albúmina. Sólo una pequeña parte (< 1%) circula como testosterona libre.

Los efectos de la testosterona pueden ser clasificados como anabólicos y sexuales, aunque la distinción es un tanto artificial. Los efectos anabólicos incluyen el desarrollo de masa muscular y fuerza, la resistencia ósea y la densidad ósea y el desarrollo lineal y la maduración. Los efectos sexuales incluyen la maduración sexual de los órganos implicados, engrosamiento de la voz, crecimiento de la barba y el pelo (características sexuales secundarias masculinas).

Los niveles de testosterona disminuyen gradualmente con la edad en los hombres (andropausia). Los síntomas de la andropausia son por lo general asociados con el envejecimiento como la pérdida de masa muscular y disminución de la densidad ósea, disminución de la resistencia física, disminución de la capacidad de almacenamiento y la pérdida de la libido.

En las mujeres de todas las edades, niveles altos de testosterona pueden estar asociados con los tumores suprarrenales y ovarios poliquísticos.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La testosterona en la sangre se une a las SHBG (60%) y, en menor cantidad, a otras proteínas (por ejemplo albúmina).

La testosterona no ligada a proteínas de transporte (<1 % del testosterona total) se define como testosterona libre

La formulación química de este kit permite liberar completamente la testosterona unida a proteínas; por lo tanto el kit Diametra Testosterone permite la medición de la concentración de la Testosterona total (combinado + libre) en la muestra. Si se desea medir la testosterona únicamente la fracción libre, utilícese el kit ELISA Diametra "Free Testosterone" ("Testosterona Libre").

La testosterona (antígeno) de la muestra compete con la testosterona antigénica marcada con peroxidasa de rabano (HRP, Conjugado) por la unión al anticuerpo anti-testosterona 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 sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción ( $H_2SO_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Testosterona en la muestra.

La concentración de Testosterona en la muestra se calcula según una serie de Calibradores.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

#### 3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

##### 1. Calibradores (5 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	<b>REF</b> DCE002/0206-0
CAL1	<b>REF</b> DCE002/0207-0
CAL2	<b>REF</b> DCE002/0208-0
CAL3	<b>REF</b> DCE002/0209-0
CAL4	<b>REF</b> DCE002/0210-0

##### 2. Control (2 frascos, 1 mL cada uno)

Control A	<b>REF</b> DCE045/0203A-0
Control B	<b>REF</b> DCE045/0203B-0

La concentración de los Controles se indica en la Hoja de Control (Certificate of Analysis)

##### 3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Testosterona conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

**REF** DCE002/0202-0

##### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpos anti Testosterona absorbido en la microplaca

**REF** DCE002/0203-0

##### 5. Sustrato 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.

Llevar 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 abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el 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 Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Azida de Sodio ( $NaN_3$ ) o Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- La Azida de Sodio, usada como conservante, 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/ $H_2O_2$  a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de testosterona de 0,2 ng/mL hasta 16 ng/mL.
- La administración de esteroides naturales o sintéticos, pueden alterar los niveles de testosterona en sangre.

### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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>4</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	0,2	1,0	4,0	16,0

Una vez abiertos, los calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

### 6.2 Preparación del Conjugado

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

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

### 6.3 Preparación de la muestra

La determinación de testosterona 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.

Los Controles están listos para usar.

### 6.4 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.

### 6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Muestra/ Control		25 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Conjugado	100 µL	100 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, hacer 6 lavados.

Substrato TMB	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 entre 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

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

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Absorbancia media

Calcular la extinción media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva de calibración ( $C_0$ - $C_4$ ) y de cada muestra.

### 8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores ( $C_0$ - $C_4$ ). 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 testosterona en suero están incluidas en los siguientes intervalos:

	n° sueros	Media ng/mL	Rango ng/mL
<b>Hombres (edad)</b>			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 1,01
12 - 18	16	5,02	0,56 - 8,63
19 - 55	16	3,54	2,12 - 6,01
> 55	16	1,51	0,11 - 7,25
<b>Mujeres (edad)</b>			
< 12	16	< 0,10	< 0,10 - 0,16
12 - 18	15	0,23	< 0,10 - 0,63
19 - 55	16	0,20	< 0,10 - 0,63
> 55	16	0,13	< 0,10 - 0,32

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 (16x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es  $\leq 7,0\%$ .

#### 10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (9x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es  $\leq 8,3\%$ .

### 10.2 Especificidad

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

Testosterona	100%
Dihydrotestosterona	2,03%
Androstenediona	0,01%
Androsterona	0,05%
DHEA-S	0%
Cortisol	0,01%
Cortisona	0%
17β Estradiol	0,16%
Prednisona	0%
Estrona	0,01%

### 10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,4 - 0,8 - 4,0 - 14,0 ng/mL de testosterona ha dado un valor medio de 98,9%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 4 veces dió una media de 99,7%.

### 10.4 Sensibilidad

La concentración mínima de Testosterone detectable que puede distinguirse del Calibrador cero es de 0,10 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.5 Correlación

El kit Testosterone ELISA Diametra se ha comparado con el kit Diametra Testosterone ELISA del método anterior. Se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 28 hombres.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,13 \cdot X + 0,06$$

$$r^2 = 0,92$$

El kit Testosterona ELISA Diametra fue comparado con otro ensayo comercial de Testosterona. Se analizaron muestras de suero de 24 mujeres y 29 hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 0,89 \cdot X + 0,24$$

$$r^2 = 0,93$$

## 11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

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

---

## BIBLIOGRAFÍA

- Joshi, U. M., et al., Steroids 34 (1) 35 (1979)
- Turkes, A., et al., J Endocrinol. 81 (2) P165 (1979)
- Ismail, A. A., Niswender, G. D. Midgley, A. R., J. Clin. Endocr. Metab. 34, 177 - 184 (1972)
- Rajkowski K.M, Cittanova N, Desfosses B. and Jayle M.F., Steroids 29 no 5 (1977)
- Widsdom G. B., Clin. Chem. 22/8, 1243 - 1255 (1976)

Ed. 07/2015

DCM002-12

**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)

	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



DCM003-11  
Ed. 01/2015

## ESTRADIOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica del 17 $\beta$ -Estradiolo nel siero o plasma umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  test

REF DKO003

### DESTINAZIONE D'USO

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

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

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

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

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

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il 17 $\beta$ -Estradiolo (antigene) presente nel campione compete con il 17 $\beta$ -Estradiolo antigenico marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-17 $\beta$ -Estradiolo adsorbito su micropietra (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 (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta della Stop solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). L'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione del 17 $\beta$ -Estradiolo presente nel campione. La concentrazione di 17 $\beta$ -Estradiolo nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

##### 1. Calibrators (6 flaconi)

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

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

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

##### 3. Conjugate (1 flacone, 22 mL)

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

##### 4. Coated Microplate (1 micropietra breakable)

Anticorpo anti-17 $\beta$ -Estradiolo adsorbito su micropietra **REF DCE002/0303-0**

##### 5. TMB Substate (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**

##### 6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

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

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

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata

### 3.3. Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

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

#### Note

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

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

## 4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 17 $\beta$ -Estradiolo da 20 pg/mL a 2000 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di 17 $\beta$ -Estradiolo.

## 5. PRECAUZIONI

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

fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

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

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

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

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

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

### 6.2. Preparazione del Coniugato

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

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

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

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

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

#### 6.4. Preparazione dei Campioni

La determinazione del 17 $\beta$ -Estradiolo può essere effettuata su siero o su plasma umano.

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

#### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 $\mu$ L		
Campione /Controllo		25 $\mu$ L	
Conjugate	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	
Incubare 2 h a +37°C. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per tre volte con 300 $\mu$ L 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente 22÷28°C, al riparo dalla luce.			
Stop Solution	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

## 7. CONTROLLO QUALITA'

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

## 8. RISULTATI

### 8.1. Estinzione media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Le concentrazioni seriche di 17 $\beta$ -Estradiolo sono comprese nei seguenti intervalli:

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

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

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

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

*10.1.2. Inter - Assay*

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

**10.2. Accuratezza**

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

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

**10.3. Sensibilità**

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

**10.4. Specificità**

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

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

**10.5. Correlazione con kit commerciale**

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

La curva di regressione è:

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

$$r^2 = 0,996$$

**11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO**

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

**BIBLIOGRAFIA**

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

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



DCM003-11  
Ed. 01/2015

# ESTRADIOL ELISA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of 17 $\beta$ -Estradiol in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  test

REF DKO003

## INTENDED USE

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

Estradiol ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

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

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

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

## 2. PRINCIPLE

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

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17 $\beta$ -Estradiol concentration in the sample.

17 $\beta$ -Estradiol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

## 3. REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

### 3.1. Reagent and material supplied in the kit

#### 1. Calibrators (6 vial)

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

#### 2. Control (1 vial, 0.5 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0303-0

#### 3. Conjugate (1 vial, 22 mL)

17 $\beta$ -Estradiol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/0302-0

#### 4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Anti 17 $\beta$ -Estradiol antibodies adsorbed on microplate

REF DCE002/0303-0

#### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0.26 g/L) (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

#### 6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

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

### 3.2. Reagents necessary not supplied in the kit

Distilled water

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

### Notes

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

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

### 4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 17β-Estradiol from 20 pg/mL to 2000 pg/mL.
- The clinical significance of 17β-Estradiol determination can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

### 5. PRECAUTIONS

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

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

### 6. PROCEDURE

#### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

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

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

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

#### 6.2. Preparation of the Conjugate

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

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

#### 6.3. Preparation of Wash Solution

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



#### 6.4. Preparation of the sample

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

#### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 $\mu$ L		
Sample/ Control		25 $\mu$ L	
Conjugate	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	
Incubate 2 h at +37°C. Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 $\mu$ L 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubate at room temperature (22 $\div$ 28°C) for 30 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Shake gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.			

#### 7. QUALITY CONTROL

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

#### 8. RESULTS

##### 8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample

##### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</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 pg/mL.

#### 9. REFERENCE VALUES

The serum 17 $\beta$ -Estradiol reference values are:

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

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

**10.1. Precision***10.1.1. Intra Assay Variation*

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

*10.1.2. Inter Assay Variation*

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

**10.2. Accuracy**

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

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

**10.3. Sensitivity**

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

**10.4. Specificity**

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

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

**10.5. Correlation with a commercial kit**

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

The linear regression curve is:

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

$$r^2 = 0.996$$

**11. WASTE MANAGEMENT**

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

**BIBLIOGRAPHY**

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

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



DCM003-11  
Ed. 01/2015

# ESTRADIOL ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de 17 $\beta$  Estradiol en suero o plasma humano

IVD



LOT  
Ver etiqueta externa

2°C 8°C



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO003

## USO PREVISTO

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

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

## 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

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

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

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

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

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

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

Por último, al reaccionar con el sustrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y el sustrato TMB (TMB), la enzima HRP presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de interrupción (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

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

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

### 3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

#### 1. Calibradores (6 frascos)

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

#### 2. Control (1 frasco, 0.5 mL)

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

REF DCE045/0303-0

#### 3. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

17 $\beta$  Estradiol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/0302-0

#### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti 17 $\beta$  Estradiol absorbido en la microplaca

REF DCE002/0303-0

5. Substrato 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 incluidos en el kit

Agua destilada

### 3.3 Material e instrumental auxiliar

Dispensadores automáticos

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

### Notas

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

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

## 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de 17β Estradiol desde 20 hasta 2000 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles hemáticos de 17β Estradiol.

## 5. PRECAUCIONES

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

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

## 6. PROCEDIMIENTO

### 6.1 Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

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

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

## 6.2 Preparación del Conjugado

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

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

## 6.3 Preparación de la solución de lavado

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

## 6.4 Preparación de la muestra

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

## 6.5 Procedimiento

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

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador $C_0$ - $C_5$	25 $\mu$ L		
Muestra/ Control		25 $\mu$ L	
Conjugado	200 $\mu$ L	200 $\mu$ L	
Incubar 2 h a 37°C. Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L	100 $\mu$ L
Agitar suavemente la placa. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

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

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Absorbancia media

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

### 8.2 Curva de calibración

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

### 8.3 Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

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

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

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

## 10. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 10.1 Precisión

#### 10.1.1 Intra ensayo

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

#### 10.1.2 Entre ensayos

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

### 10.2 Exactitud

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

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

### 10.3 Sensibilidad

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

### 10.4 Especificidad

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

17 Estradiol	100 %
Estrona	2 %
Estriol	0.39 %
Testosterona	0.02 %
Cortisol	< $7 \times 10^{-3}$ %
Progesterona	< $3 \times 10^{-4}$ %
Dhea-s	< $1 \times 10^{-4}$ %

### 10.5 Correlación

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

Se calculó la curva de regresión lineal:

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

$$r^2 = 0,996$$

## 11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

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

## BIBLIOGRAFÍA

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

Ed. 01/2015

DCM003-11

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,

06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](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



DCM006-9  
Ed. 01/2015

# PROGESTERONE ELISA

per analisi di routine

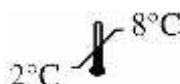
Determinazione immunoenzimatica diretta del Progesterone nel siero o plasma umano

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<sup>R</sup> 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/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 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	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. <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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) 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	
<b>UOMINI</b>		< 1,0	
<b>DONNE</b>	<b>fase follicolare</b>	0,1 - 1,4	
	<b>fase medioluteinica</b>	4,0 - 25,0	
	<b>menopausa</b>	< 1,0	
	<b>gravidanza</b>	<b>Settimane</b>	
		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 $\alpha$ OH-progesterone	0,29 %
17 $\beta$ 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](mailto:info@diametra.com)



DCM006-9  
Ed. 01/2015

# PROGESTERONE ELISA

for routine analysis

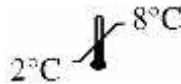
Direct immunoenzymatic determination of Progesterone in human serum or plasma

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 myelinization.

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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

Before using leave 5 minutes on a rotary shaker.

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	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. <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. <b>Automatic washer:</b> 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</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. REFERENCE VALUES

The serum or plasma Progesterone reference values are:

		ng/mL	
<b>MEN</b>		< 1.0	
<b>WOMEN</b>	<b>follicular phase</b>	0.1 - 1.4	
	<b>Midluteinic phase</b>	4.0 - 25.0	
	<b>menopause</b>	< 1.0	
	<b>pregnancy</b>	<b>Weeks</b>	
		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](mailto: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 $\alpha$ OH-progesterone	0,29 %
17 $\beta$ 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



LOT  
Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). 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 absorbido 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<sup>R</sup> 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

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 <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	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. <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.			
<b>Lavados automático:</b> 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<sub>m</sub>) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) y de cada muestra.

#### 8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>). 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	
<b>HOMBRES</b>		< 1,0	
<b>MUJERES:</b>	<b>fase folicular</b>	0,1 - 1,4	
	<b>fase medio-lútea</b>	4,0 - 25,0	
	<b>menopausia</b>	< 1,0	
	<b>embarazo</b>	<b>semana</b>	
		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 $\alpha$ OH-progesterona	0,29 %
17 $\beta$ 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](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





DCM009-12  
Ed. 01/2015

# LH ELISA

per analisi di routine

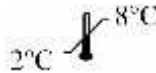
Test per la determinazione immunoenzimatica diretta dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO009

## DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra LH ELISA è un metodo immunoenzimatico in fase solida per la determinazione quantitativa dell'ormone luteinizzante (LH) nel siero o plasma umano. Il kit LH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Ormone Luteinizzante (LH) è una glicoproteina composta da subunità di peso molecolare di circa 30,000 daltons. La subunità è simile quella degli altri ormoni pituitari [ormone follicolo-stimolante (FSH), ormone stimolante la tiroide (TSH) e gonadotropina corionica (HGC)] mentre la subunità è unica. Essa conferisce alla molecola l'attività biologica. La subunità consiste di 89 residui aminoacidici, mentre la subunità contiene 129 aminoacidi. Il contenuto in carboidrati varia dal 15% al 30%. L'utilità clinica della determinazione dell'ormone luteinizzante (LH) nell'accertamento dell'omeostasi della regolazione della fertilità via asse ipotalamico-pituitario-gonadico è stata largamente dimostrata (1,2). Inoltre, la comparsa delle tecnologie relative alla fecondazione *in vitro* (IVF) volte alla risoluzione dei problemi di infertilità ha conferito un'ulteriore spinta al rapido sviluppo delle metodologie di determinazione dell'LH: dal saggio biologico tecnicamente complesso (3) al saggio più semplice e rapido di tipo immunoenzimatico.

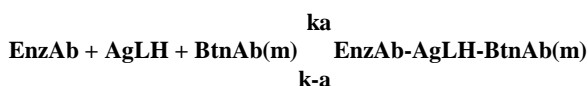
## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Saggio immunoenzimatico.

In questo metodo calibratori, i campioni e/o controlli (contenenti l'antigene LH nativo), sono aggiunti nei pozzetti della micropiastra sensibilizzati con streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti in eccesso sia anticorpi anti-LH monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso *sandwich* solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



**BtnAb(m)** = anticorpo biotinilato monoclonale (in eccesso)

**AgLH** = antigene nativo (quantità variabile)

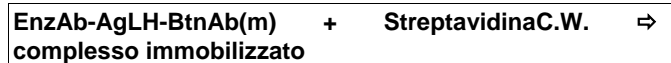
**EnzAb** = anticorpo marcato con enzima (in eccesso)

**EnzAb-AgLH-BtnAb(m)** = complesso sandwich antigene-anticorpi

**ka** = costante di associazione

**k-a** = costante di dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:



**Streptavidina C.W.** = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

**Complesso immobilizzato** = Legame sandwich Anticorpo-Antigene legato alla superficie

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata dell'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante un lavaggio. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero. L'attività dell'enzima è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione. Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

##### 1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/0906-0
CAL1	REF	DCE002/0907-0
CAL2	REF	DCE002/0908-0
CAL3	REF	DCE002/0909-0
CAL4	REF	DCE002/0910-0
CAL5	REF	DCE002/0911-0

##### 2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è riportata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/0903-0

##### 3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpi anti LH coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e anti LH biotinilato

REF DCE002/0902-0

##### 4. Coated microplate (1 microplate breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF DCE002/0903-0

##### 5. 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

##### 6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

##### 7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

#### Note

Conservare i reattivi a 20±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<sup>R</sup> 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/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 LH da 5 mIU/mL a 200 mIU/mL.

### 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il riferimento internazionale WHO 1st IRP 68/40 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	25	50	100	200

Per campioni con concentrazione superiore a 200 mIU/mL diluire il campione con il Calibratore 0.

Dopo l'apertura, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

### 6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero o plasma al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,040 mL dei campioni.

### 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 dei test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni/Controllo	Bianco
Campioni / Controllo		20 µL	
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione, lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrato	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 DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nell'intervallo basso, normale ed alto della curva di calibrazione per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta.

Conservare i fogli di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti.

Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento.

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 (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI ATTESI

Gli intervalli di riferimento sono riportati come segue:

	LH (mIU/mL)
<b>MASCHI:</b>	0,7 – 7,4
<b>FEMMINE:</b>	
Fase follicolare	0,5 – 10,5
Fase Ovulatoria	18,4 – 61,2
Fase luteinica	0,5 – 10,5
Menopausa	8,2 – 40,8

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. LIMITI DELLA PROCEDURA

L'ormone LH viene soppresso dagli estrogeni, tuttavia nelle donne che assumono contraccettivi per via orale, i livelli possono risultare bassi o normali. Diete troppo radicali e perdite di peso repentine possono abbassare la concentrazione di gonadotropina. L'ormone luteinizzante dipende da fattori diversi dall'omeostasi pituitaria.

Pertanto, limitarsi a una determinazione non è sufficiente per effettuare una stima dello status clinico.

## 11. CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

### 11.1. Precisione

#### 11.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso dosaggio è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 9,21%.

#### 11.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi 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 7,91%.

### 11.2. Correlazione

Il kit LH ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 36 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$\text{Diametra} = 0,91 * (\text{commercial kit}) + 0,05$$

$$R \text{ quadro} = 0,971$$

Il nuovo kit LH ELISA Diametra è stato comparato al vecchio kit LH ELISA Diametra. Sono stati testati 36 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$(\text{Diametra new}) = 1,08 * (\text{Diametra old}) - 1,22$$

$$R \text{ quadro} = 0,981$$

## 11.3. Sensibilità

La concentrazione minima misurabile di LH che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,22 mIU/mL.

## 11.4. Specificità

La cross-reattività del kit Diametra LH verso le sostanze potenzialmente interferenti è stata stimata aggiungendo tali sostanze, a varie concentrazioni, ad una matrice di siero. La cross-reattività è stata calcolata mediante un rapporto fra dose di sostanza interferente e dose di Ormone Luteinizzante necessario per produrre la stessa OD.

Sostanza testata	Cross Reattività
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

## 11.5. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre differenti campioni arricchiti con 5,63 - 11,25 - 22,5 - 45 - 90 mIU/mL di LH, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 97,17%  $\pm$  4,00%. Per la prova di diluizione sono stati diluiti 3 diversi campioni 2, 4, 8 e 16 volte con Calibratori 0; il valore medio ( $\pm$ SD) ottenuto è 99,13%  $\pm$  7,37%.

## 11.6. Effetto Hook

Il kit Diametra LH non presenta effetto Hook fino a 400 mIU/mL.

## 12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine*, **26** (1981) pg. 201-6.
2. Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 336-40.
3. Braunstein G.D., et al., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **126** (1976) pg. 678-81.
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology*, **6** (1975) pg. 145-84.
5. Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 1-12.
6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **131** (1978) pg. 25-32.
7. Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **37** (1982) pg. 773-78.

Ed. 01/2015

DCM009-12

**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)



DCM009-12  
Ed. 01/2015

## LH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of the luteinizing hormone (LH) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$  tests

REF DKO009

### INTENDED USE

DiaMetra LH ELISA kit is a solid phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of the luteinizing hormone (LH) concentration in human serum or plasma.

LH ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Luteinizing hormone (LH) is a glycoprotein consisting of two subunits with a molecular mass of 30,000 daltons. The  $\alpha$ -subunit is similar to other pituitary hormones [follicle stimulating hormone (FSH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (HCG)] while the  $\beta$ -subunit is unique. The  $\beta$ -subunit confers the biological activity to the molecule.

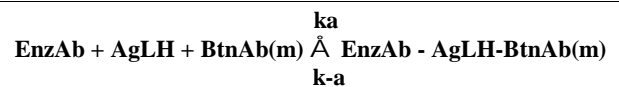
The  $\alpha$ -subunit consists of 89 amino acid residues while the  $\beta$ -subunit contains 129 amino acids. The carbohydrate content is between 15% and 30%. The clinical usefulness of the measurement of luteinizing hormone (LH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic - pituitary - gonadal axis has been well established (1,2). In addition, the advent of in vitro fertilization (IVF) technology to overcome infertility associated problems has provided the impetus for rapid improvement in LH assay methodology from the technically demanding bioassay (3) to the procedurally simple and rapid immunoenzymometric assays.

### 2. PRINCIPLE OF THE TEST

Immunoenzymometric assay.

In this method, the LH calibrators, the patient specimens and/or the controls (containing the native antigen) are first added to streptavidin coated wells. Then monoclonal biotinylated and enzyme labeled antibodies are added and the reactants mixed: these antibodies have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of LH. A reaction between the various LH antibodies and native LH occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated in the following equation:



**BtAb(m)** = biotinylated monoclonal antibody (excess quantity)

**AgLH** = native antigen (variable quantity)

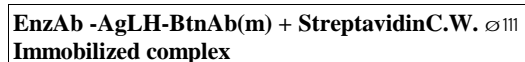
**EnzAb** = enzyme labeled antibody (excess quantity)

**EnzAb-AgLH-BtAb(m)** = antigen-antibodies sandwich complex

**ka** = rate constant of association

**k-a** = rate constant of dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



**Streptavidin C.W.** = streptavidin immobilized on well.

**Immobilized complex** = antibodies-antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well quantitated by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	REF	DCE002/0906-0
CAL1	REF	DCE002/0907-0
CAL2	REF	DCE002/0908-0
CAL3	REF	DCE002/0909-0
CAL4	REF	DCE002/0910-0
CAL5	REF	DCE002/0911-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis **REF DCE045/0903-0**

##### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibodies anti LH conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and anti LH biotinilated **REF DCE002/0902-0**

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Streptavidin adsorbed on microplate **REF DCE002/0903-0**

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

#### 3.1. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

#### 3.2. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

#### Note

Store all reagents at 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<sup>R</sup> as preservative. 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/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 LH from 5 mIU/mL to 200 mIU/mL.

### 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the international reference WHO 1st IRP 68/40 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	25	50	100	200

For sample with concentration over 200 mIU/mL dilute the sample with the Calibrator 0.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2÷8°C.

### 6.2. Preparation of the Wash solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2÷8°C.

### 6.3. Preparation of the sample

The specimens shall be serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum or plasma sample should be obtained.

To obtain serum samples, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2÷8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0,040 mL of the specimen is required.

### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		20 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well and wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> 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 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 levels in the low, medium and high ranges of the dose response curve 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. 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

### 5.1. 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>5</sub>) and of each sample.

### 5.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (E<sub>m</sub>) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

### 5.3. Calculation of Results

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



## 9. EXPECTED VALUES

Reference ranges are hereby reported:

	LH (mIU/mL)
<b>MALE:</b>	0.7 – 7.4
<b>FEMALE:</b>	
<b>Follicular phase</b>	0.5 – 10.5
<b>Ovulation phase</b>	18.4 – 61.2
<b>Lutheal phase</b>	0.5 – 10.5
<b>Menopausal</b>	8.2 – 40.8

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. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

LH is suppressed by estrogen but in woman taking oral contraceptives the level may be low or normal. Excessive dieting and weight loss may lead to low gonadotropin concentrations. Luteinizing hormone is dependent upon diverse factors other than pituitary homeostasis. Thus, the determination alone is not sufficient to assess clinical status.

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Precision

#### 11.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is 9.21%.

#### 11.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurements of three different control sera in different lots. The between assay variability is 7.91%.

### 11.2. Correlation

Diametra LH ELISA kit was compared to a commercially available LH kit. 36 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$\text{Diametra} = 0.91 * (\text{commercial kit}) + 0.05$$

$$R \text{ squared} = 0.971$$

The new Diametra LH kit was compared to the old Diametra LH kit. 36 serum samples were tested.

The regression curve is:

$$(\text{Diametra new}) = 1.08 * (\text{Diametra old}) - 1.22$$

$$R \text{ squared} = 0.981$$

### 11.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of LH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.22 mIU/mL.

## 11.4. Specificity

The cross-reactivity of the Diametra LH kit to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of Luteinizing Hormone needed to produce the same absorbance.

Substance tested	Cross Reactivity
<b>LH</b>	100 %
<b>HCG</b>	0.007 %
<b>Prolactin</b>	N.D.
<b>FSH</b>	N.D.
<b>TSH</b>	N.D.

## 11.5. Accuracy

The recovery test performed on three different samples, enriched with 5.63 - 11.25 - 22.5 - 45 - 90 mIU/mL of LH, gave a average value ( $\pm$ SD) of 97.17%  $\pm$  4.00%.

In the dilution test three different samples were diluted 2, 4, 8 and 16 times with Calibrator 0; the average value ( $\pm$ SD) obtained is 99.13%  $\pm$  7.37%.

## 11.6. Hook Effect

Diametra LH assay shows no Hook Effect up to 400 mIU/mL.

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

- 1 Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine*, **26** (1981) pg. 201-6.
- 2 Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 336-40.
- 3 Braunstein G.D., et al., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **126** (1976) pg. 678-81.
- 4 Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology*, **6** (1975) pg. 145-84.
- 5 Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 1-12.
- 6 Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **131** (1978) pg. 25-32.
- 7 Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **37** (1982) pg. 773-78.

Ed. 01/2015

DCM009-12

**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)



DCM009-12

Ed. 01/2015

## LH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO009

### USO PREVISTO

El kit Diametra LH ELISA es un método inmunoenzimático en fase sólida para la determinación cuantitativa de la hormona luteinizante (LH) en suero o plasma humano.

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

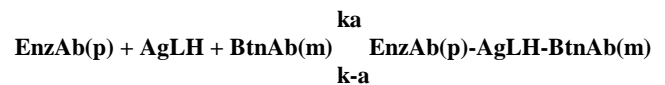
### 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La hormona luteinizante (LH) es una glicoproteína compuesta por subunidades de peso molecular de aproximadamente 30 000 dalton. La subunidad es similar a la de las otras hormonas pituitarias [hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG)], mientras que la subunidad es única. Esta confiere a la molécula la actividad biológica. La subunidad consta de 89 residuos de aminoácidos, mientras que la subunidad contiene 129 aminoácidos. El contenido de carbohidratos varía del 15% al 30%. La utilidad clínica de la determinación de la hormona luteinizante (LH) en la evaluación de la homeostasis de la regulación de la fertilidad a través del eje hipotalámico-pituitario-gonadal ha sido ampliamente demostrada (1,2). Además, la aparición de las tecnologías relacionadas con la fecundación *in vitro* (FIV) dirigidas a la resolución de problemas de infertilidad ha dado un nuevo impulso al rápido desarrollo de métodos para la determinación de la LH: desde el ensayo biológico técnicamente complejo (3) hasta el ensayo más simple y rápido de tipo inmunoenzimático.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Ensayo inmunoenzimático.

En este método, los calibradores, muestras y/o controles (que contienen el antígeno LH nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados con estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-LH monoclonales biotinilados y anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítopos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.



La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:

**BtnAb(m)** = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

**AgLH** = antígeno nativo (cantidad variable)

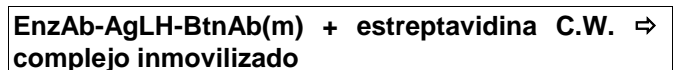
**EnzAb** = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

**EnzAb-AgLH-BtnAb(m)** = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

**k<sub>a</sub>** = constante de asociación

**k<sub>-a</sub>** = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:



**Estreptavidina C.W.** = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

**Complejo inmovilizado** = enlace sándwich anticuerpo-antígeno unido a la superficie

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante un lavado.

La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

##### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/0906-0
CAL1	REF	DCE002/0907-0
CAL2	REF	DCE002/0908-0
CAL3	REF	DCE002/0909-0
CAL4	REF	DCE002/0910-0
CAL5	REF	DCE002/0911-0

##### 2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/0903-0

##### 3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti LH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti LH biotinilado

REF DCE002/0902-0

##### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/0903-0

##### 5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0,26 g/L (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE004-0

##### 6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)

REF DCE005-0

##### 7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 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.

Llevar 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, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

#### 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<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la

inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.

- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/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 LH de 5 mIU/mL a 200 mIU/mL

#### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada 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>5</sub>)

Los Calibradores son listos para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1st IRP 68/40 y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	25	50	100	200

Para muestras con una concentración superior a 200 mIU/mL, diluir la muestra con el Calibrador 0.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8 °C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras séricas y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2÷8 °C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,040 mL de la muestra.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras/Control	Blanco
Muestras/Control		20 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	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 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 dentro de los 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados.

Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias.

Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden 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 (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>). 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 mIU/mL.

## 9. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de referencia se indican del siguiente modo:

	LH (mIU/mL)
<b>HOMBRES:</b>	0,7 – 7,4
<b>MUJERES:</b>	
Fase folicular	0,5 – 10,5
Fase ovulatoria	18,4 – 61,2
Fase lútea	0,5 – 10,5
Menopausia	8,2 – 40,8

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. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La hormona LH es suprimida por los estrógenos, pero en mujeres que toman anticonceptivos orales, los niveles pueden ser bajos o normales. Dietas demasiado radicales y pérdidas de peso repentinas pueden reducir la concentración de gonadotropina. La hormona luteinizante depende de factores distintos de la homeostasis pituitaria.

Por lo tanto, limitarse a una determinación no es suficiente para realizar una estimación del estado clínico.

## 11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 11.1. Precisión

#### 11.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 9.21%.

#### 11.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 7.91%.

### 11.2. Correlación con la dosis RIA

El kit LH ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 36 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 0,91 * (\text{ensayo comercial}) + 0,05$$

$$r^2 = 0,971$$

El kit LH ELISA Diametra (Y) se ha comparado con el kit LH ELISA Diametra del método anterior (X). Se probaron 36 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1.08 * (X) - 1.22$$

$$r^2 = 0.981$$

### 11.3. Sensibilidad

La concentración mínima de LH que puede distinguirse del Calibrador cero es de 0,22 mIU/mL.

### 11.4. Especificidad

La reactividad cruzada del kit LH Diametra a las sustancias potencialmente interferentes se estimó mediante la adición de estas sustancias, en concentraciones diferentes, a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó mediante una relación entre dosis de sustancia interferente y dosis de hormona luteinizante necesaria para producir la misma DO.

Sustancia	Reactividad cruzada
LH	100 %
HCG	0,007 %
Prolactin	N.D.
FSH	N.D.
TSH	N.D.

### 11.5. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 5.63 – 11.25 – 22.5 – 45 – 90 mIU/mL de LH ha dado un valor medio ( $\pm$ DE) de 97.17%  $\pm$  4.00%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces con Calibrador 0 dio una media ( $\pm$  DE) de 99.13%  $\pm$  7.37%.

### 11.6. Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 400 mIU/mL.

## 12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kosasa T.S., "Measurement of Human Luteinizing Hormone." *Journal of Reproductive Medicine*, **26** (1981) pg. 201-6.
2. Danzer H., Braunstein G.D., et al., "Maternal Serum Human Chorionic Gonadotropic Concentrations and Fetal Sex Predictions." *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 336-40.
3. Braunstein G.D., et al., "Serum Human Luteinizing Hormone Levels through Normal Pregnancy", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **126** (1976) pg. 678-81.
4. Goldstein D.P., and Kosasa T.S., "The Subunit Radioimmunoassay for LH Clinical Application." *Gynecology*, **6** (1975) pg. 145-84.
5. Batzer F., "Hormonal Evaluation of Early Pregnancy", *Fertility and Sterility*, **34** (1980) pg. 1-12.

6. Braunstein, G.D., et al., "First-Trimester Luteinizing Hormone Measurements as an Aid to the Diagnosis of Early Pregnancy Disorders", *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **131** (1978) pg. 25-32.
7. Lenton E., Neal L. and Sulaiman R., "Plasma Concentrations of Human Gonadotropin from the time of Implantation until the Second Week of Pregnancy ", *Fertility and Sterility*, **37** (1982) pg. 773-78.

**Ed. 01/2015**

**DCM009-12**

**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)

	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



DCM010-13  
Ed. 01/2015

## FSH ELISA

per analisi di routine

Test per la determinazione immunoenzimatica diretta dell'Ormone Follicolo-Stimolante (FSH) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO010

### DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra FSH ELISA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'Ormone Follicolo-Stimolante (FSH) nel siero o plasma umano. Il kit FSH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. INTRODUZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

L'ormone follicolo-stimolante (FSH) è una glicoproteina costituita da 2 subunità aventi una massa molecolare di circa 35,500 daltons. La subunità  $\alpha$  è simile a quella degli altri ormoni pituitari [ormone luteinizzante (LH), ormone stimolante la tiroide (TSH) e gonadotropina corionica (hGC)] mentre la subunità  $\beta$  è unica. La subunità  $\beta$  conferisce l'attività biologica alla molecola. La stimolazione dell'ormone rilasciante la gonadotropina (GnRH) provoca il rilascio dell'FSH e dell'LH dalla ghiandola pituitaria, e questi vengono trasportati dal sangue fino ai siti in cui agiscono, cioè i testicoli e le ovaie.

Negli uomini, l'FSH agisce sulle cellule del Sertoli dei testicoli, stimolando la sintesi dell'inibina, che pare inibire specificatamente una ulteriore secrezione di FSH, e della proteina legante androgena. Quindi, esso favorisce indirettamente la spermatogenesi.

Nelle donne, l'FSH agisce sulle cellule granulose delle ovaie, stimolando la steroidogenesi. Tutti i cicli mestruali con ovulazione possiedono una sequenza caratteristica di secrezione di FSH e di LH. Il ciclo mestruale è suddiviso in fase follicolare e fase luteinica dall'impulso che avviene a metà ciclo delle gonadotropine (LH and FSH). Con l'avanzare della fase follicolare, la concentrazione di FSH diminuisce. Con l'avvicinarsi del momento dell'ovulazione, circa a metà ciclo, l'FSH raggiunge il massimo livello (con una entità minore tuttavia, dell'LH).

L'utilità clinica della determinazione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) nell'accertamento dell'omeostasi della regolazione di fertilità via asse ipotalamico - pituitario - gonadico è stata largamente dimostrata (1,2).

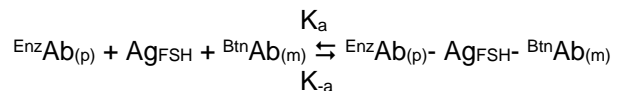
### 2. PRINCIPIO DEL TEST

I reagenti essenziali richiesti per il test immunoenzimatico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (coniugati con enzima e immobilizzati) con riconoscimento di epitopi diversi e distinti, in eccesso, e antigene nativo.

In questo procedimento l'immobilizzazione si verifica durante il test sulla superficie dei pozzetti della micropiastra attraverso l'interazione della streptavidina fissata sui pozzetti e dell'anticorpo anti FSH biotinilato aggiunto.

Mescolando l'anticorpo biotinilato, l'anticorpo coniugato con enzima e un siero contenente l'antigene nativo, si verifica la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi, senza competizione e ingombro sterico, per formare un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

$\text{Ag}_{\text{FSH}}$  = antigene FSH nativo (quantità variabile)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = anticorpo policlonale marcato con enzima (quantità in eccesso)

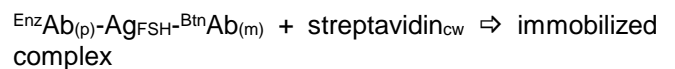
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = complesso sandwich antigene-anticorpi

$\text{K}_a$  = costante di associazione

$\text{K}_{-a}$  = costante di dissociazione

Contemporaneamente il complesso si fissa sul pozzetto tramite la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato.

Questa interazione è descritta di seguito:



$\text{Streptavidin}_{\text{cw}}$  = streptavidina immobilizzata sul pozzetto

Immobilized complex = complesso sandwich antigene-anticorpi

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione di antigene legata all'anticorpo viene separata dall'antigene libero con un lavaggio. L'attività enzimatica della frazione legata è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo.

Utilizzando diversi sieri di riferimento con valori noti di antigene è possibile costruire una curva dose-risposta sulla quale determinare la concentrazione dell'antigene di campioni ignoti.

### 3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/1006-0
CAL1	REF	DCE002/1007-0
CAL2	REF	DCE002/1008-0
CAL3	REF	DCE002/1009-0
CAL4	REF	DCE002/1010-0
CAL5	REF	DCE002/1011-0

2. Control (1 fialone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/1003-0

3. Conjugate (1 fialone, 12 mL)

Anticorpo anti FSH coniugato a Perossidasi di rafano (HRP)

Anticorpo anti FSH coniugato a Biotina

REF DCE002/1002-0

4. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF DCE002/1003-0

5. TMB Substrate (1 fialone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0,26 g/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

6. Stop Solution (1 fialone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

7. 10X Conc. Wash Solution (1 fialone, 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.

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

#### Note

Conservare 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<sup>R</sup> 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/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 FSH da 5 mIU/mL a 100 mIU/mL.

### 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro lo Standard Internazionale WHO 2<sup>nd</sup> IRP 78/549 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

Per campioni con concentrazione superiore a 100 mIU/mL diluire 1:2 il campione con il Calibratore 0.

Dopo l'apertura, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione della soluzione di lavaggio

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.

### 6.3. Preparazione del Campione

Utilizzare campioni di siero o plasma.

Nota: si sconsiglia l'utilizzo di EDTA-plasma, in quanto potrebbe interferire con il dosaggio del campione.

Osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,100 mL dei campioni.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratori	Campioni /Controllo	Bianco
Campioni /Controllo		50 µL	
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrato	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 DI QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe testare i controlli interni con livelli compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta. Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento. Deviazioni significative rispetto alle prestazioni stabilite 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<sub>m</sub>) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare su un grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (E<sub>m</sub>) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI ATTESI

Gli intervalli di riferimento sono riportati nella tabella seguente:

	FSH (mIU/mL)
<b>MASCHI</b>	1 – 14
<b>FEMMINE:</b>	
Fase follicolare	3 – 12
Fase ovulatoria	8 – 22
Fase luteinica	2 – 12
Menopausa	35 – 151

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. LIMITI DELLA PROCEDURA

- **Per uso diagnostico considerare i valori di FSH in aggiunta ad altri dati disponibili al medico.** Seguire le note procedurali ed eseguire attentamente il test al fine di ottenere risultati validi. Qualsiasi modifica della procedura potrebbe alterare i risultati. FSH dipende da svariati fattori diversi dall'omeostasi della pituitaria. La sola determinazione di FSH non può quindi fornire un completo quadro clinico sullo stato del paziente.
- FSH è soppresso dagli estrogeni ma nelle donne che fanno uso di contraccettivi orali i livelli possono essere bassi o normali. Diete drastiche e perdita di peso comportano una riduzione della concentrazione di gonadotropina
- Per campioni di pazienti con alti livelli di FSH possono si può verificare l'effetto gancio, per cui essi possono presentare paradossalmente bassi valori di assorbanza. Si consiglia di diluire 1:100 con il calibratore 0 quindi dosarli nuovamente (moltiplicare il risultato per 100). Tuttavia, è stato riscontrato che valori fino a 2000 mIU/mL hanno avuto una assorbanza maggiore di quella del calibratore più alto.
- Pazienti che ricevono preparazioni di anticorpi monoclonali murini per la diagnosi della terapia possono presentare anticorpi umani anti-topo (HAMA) e quindi dare risultati falsi positivi o falsi negativi.

## 11. CARATTERISTICHE DEL SAGGIO

### 11.1. Precisione

#### 11.1.1. Intra-assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo in un'unica seduta analitica. La variabilità intra-assay è  $\leq 9,7\%$ .

#### 11.1.2. 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  $\leq 8,0$ .

### 11.2. Correlazione

Il kit Diametra FSH (Y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (X). Sono stati testati 35 sieri. La curva di regressione lineare è:

$$Y = 0,91 \cdot X + 3,41$$

$$r^2 = 0,969$$

Il nuovo kit Diametra FSH (Y) è stato comparato con il precedente kit Diametra FSH (X). Sono stati testati 60 sieri. La curva di regressione lineare è:

$$Y = 1,01 \cdot X - 0,44$$

$$r^2 = 0,953$$

### 11.3. Sensibilità

La concentrazione minima di FSH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,17 mIU/mL.

### 11.4. Specificità

La cross-reattività del kit FSH Diametra verso le sostanze potenzialmente interferenti è stata stimata aggiungendo le sostanze a varie concentrazioni ad una matrice di siero. La cross-reattività è stata calcolata valutando il rapporto tra la concentrazione della sostanza interferente e la concentrazione di FSH necessario per produrre la stessa OD.

Sostanza testata	Concentrazione	Cross Reattività
FSH	---	100,0%
HCG	5000 mIU/mL	N.D.
LH	400 mIU/mL	N.D.
Prolactin	2000 ng/mL	N.D.
TSH	1000 mIU/L	N.D.

### 11.5. Accuratezza

Tre differenti campioni sono stati arricchiti con 3, 6, 12 e 24 mIU/mL di FSH; la prova di recupero ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di  $97,83\% \pm 8,52\%$ .

Tre differenti campioni sono stati diluiti 2, 4 e 8 volte con il Calibratore 0; la prova di diluizione ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di  $105,54\% \pm 5,36\%$ .

## 12. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551 (1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 59 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab.* 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the folliclestimulating hormone  $\beta$  subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805– 1813.
- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirrhofer S, Hoermann R, Isaacs N, Jackson A, Klonisch T, Laphorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, SchwarzS, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

**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)





DCM010-13  
Ed. 01/2015

## FSH ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of the Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO010

### INTENDED USE

Diametra FSH ELISA kit is a direct solid phase immunoassay for the quantitative determination of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) in human serum or plasma.

FSH ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

Follicle Stimulating hormone (FSH) is a glycoprotein consisting of two subunits with an approximate molecular mass of 35,500 daltons. The  $\alpha$ - subunit is similar to other pituitary hormones [luteinizing stimulating hormone (LH), thyroid stimulating hormone (TSH) and chorionic gonadotropin (hCG)] while the  $\beta$ -subunit is unique. The  $\beta$ - subunit confers the biological activity to the molecule. Stimulation by gonadotropin-releasing hormone (GnRH) causes release of FSH, as well as LH, from the pituitary and is transported by the blood to their sites of action, the testes or ovary.

In men, FSH acts on the Sertoli cells of the testis, stimulating the synthesis of inhibin, which appears to specifically inhibit further FSH secretion, and androgen-binding protein. Thus, it indirectly supports spermatogenesis.

In women, FSH acts on the granulosa cells of the ovary, stimulating steroidogenesis. All ovulatory menstrual cycles have a characteristic pattern of FSH, as well as LH, secretion. The menstrual cycle is divided into a follicular phase and a luteal phase by the midcycle surge of the gonadotropins (LH and FSH). As the follicular phase progresses, FSH concentration decreases. Near the time ovulation occur, about midcycle, FSH peaks (lesser in magnitude than LH) to its highest level.

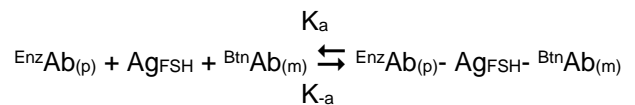
The clinical usefulness of the measurement of Follicle Stimulating hormone (FSH) in ascertaining the homeostasis of fertility regulation via the hypothalamic - pituitary - gonadal axis has been well established (1,2).

### 2. PRINCIPLE OF THE TEST

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme-linked and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this procedure the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti FSH antibody.

Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, the enzyme labeled antibody and a serum containing the native antigen, reaction results between the native antigen and the antibodies without competition or steric hindrance to form a soluble sandwich complex. The interaction is illustrated by the following equation:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = biotinylated monoclonal antibody (Excess quantity)

$\text{Ag}_{\text{FSH}}$  = native FSH antigen (variable quantity)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = enzyme labeled polyclonal antibody (Excess quantity)

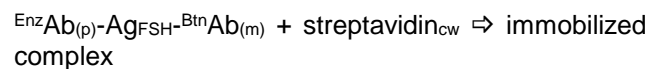
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = antigen-antibodies sandwich complex

$\text{K}_a$  = rate constant of association

$\text{K}_{-a}$  = rate constant of disassociation

Simultaneously the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



$\text{Streptavidin}_{\text{cw}}$  = streptavidin immobilized on well

Immobilized complex = antibodies-antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step.

The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration.

By using several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be



generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1 Reagents and Materials Supplied in the Kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	<b>REF</b> DCE002/1006-0
CAL1	<b>REF</b> DCE002/1007-0
CAL2	<b>REF</b> DCE002/1008-0
CAL3	<b>REF</b> DCE002/1009-0
CAL4	<b>REF</b> DCE002/1010-0
CAL5	<b>REF</b> DCE002/1011-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis **REF** DCE045/1003-0

##### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibody anti FSH conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

Antibody anti FSH conjugated with Biotine

**REF** DCE002/1002-0

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Streptavidin adsorbed on microplate

**REF** DCE002/1003-0

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 at 2-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 4 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, it is stable up to 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<sup>R</sup> as preservative. 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/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 FSH from 5 to 100 mIU/mL.

#### 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the International Standard WHO 2<sup>nd</sup> IRP 78/549 and have the following concentration:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

For sample with concentration over 100 mIU/mL dilute the sample 1:2 with the Calibrator 0.

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2±8°C.

### 6.2. Preparation of the Wash Solution

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

### 6.3. Preparation of the sample

The specimens should be human serum or plasma.

Note: it is recommended to avoid the use of EDTA-plasma, because it could interfere with the sample assay.

The usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2±8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, the samples may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0.100 mL of the specimen is required.

### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample /Control		50 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> 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 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 levels of a low, normal, and high range 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. 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.

If computer controlled data reduction is used to calculate the results of the test, it is imperative that the predicted values for the calibrators fall within 10% of the assigned concentrations.

## 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>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration Curve

Plot the mean value of absorbance (E<sub>m</sub>) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</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 mIU/mL.

## 9. EXPECTED VALUES

Reference ranges are reported below:

	FSH (mIU/mL)
<b>MALE</b>	1 – 14
<b>FEMALE:</b>	
Follicular phase	3 – 12
Mid-cycle	8 – 22
Luteal phase	2 – 12
Menopausal	35 – 151

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. LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

- **For diagnostic purposes FSH values should be used as an adjunct to other data available to the physician.** Procedural directions must be followed exactly and careful technique must be used to obtain valid results. Any modification of the procedure is likely to alter the results. FSH is dependent upon diverse factors other than pituitary homeostasis. Thus, the determination of FSH alone is not sufficient to assess clinical status.
- FSH is suppressed by estrogen but in woman taking contraceptives the level may be low or normal. Excessive dieting and weight loss may lead to low gonadotropin concentration.
- Patients specimens with abnormally high FSH levels can cause a hook effect, that is, paradoxical low absorbance results. If this is suspected, dilute the specimen 1:100 with the Calibrator 0, re-assay (multiply the result by 100). However, values as high as 2000 mIU/mL have been found to absorb greater than the absorbance of the highest calibrator.
- Patients receiving preparations of mouse monoclonal antibodies for diagnosis of therapy may contain human anti-mouse antibodies (HAMA) and may show either falsely elevated or depressed values when assayed.

## 11. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 11.1. Precision

#### 11.1.1. Intra-Assay

Within-run precision was determined by replicate (20x) the measurement of three different control sera in one assay. The within-assay variability is  $\leq 9.7\%$ .

#### 11.1.2. Inter-Assay

Between-run precision was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera in different lots of kits. The between-assay variability is  $\leq 8.0\%$ .

### 11.2. Correlation

Diametra FSH kit (Y) was compared to a commercially available FSH kit (X). 35 serum samples have been tested. The linear regression curve was:

$$Y = 0.91 \cdot X + 3.41$$

$$r^2 = 0.969$$

The new Diametra FSH kit (Y) was compared to the previous Diametra FSH kit (X): 60 serum samples have been tested. The linear regression curve was:

$$Y = 1.01 \cdot X - 0.44$$

$$r^2 = 0.953$$

### 11.3. Sensitivity

The minimal detectable concentration of FSH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.17 mIU/mL.

### 11.4. Specificity

The cross-reactivity of the Diametra FSH ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated by deriving a ratio between dose of interfering substance to dose of Follicle Stimulating Hormone needed to produce the same OD.

Substance	Concentration	Cross Reactivity
<b>FSH</b>	---	100,0%
<b>HCG</b>	5000 mIU/mL	N.D.
<b>LH</b>	400 mIU/mL	N.D.
<b>Prolactin</b>	2000 ng/mL	N.D.
<b>TSH</b>	1000 mIU/L	N.D.

### 11.5. Accuracy

Three different samples were spiked with 3, 6, 12 and 24 mIU/mL of FSH; the recovery test showed an average value ( $\pm$  SD) of  $97.83\% \pm 8.52\%$ .

Three different samples were diluted 2, 4 and 8 times with the Calibrator 0; the dilution test showed an average value ( $\pm$  SD) of  $105.54\% \pm 5.36\%$ .

## 12. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551(1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 591 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)* 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab.* 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone  $\beta$  subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805–1813.
- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N Jackson A, Klonisch T, Laphorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, Schwarz S, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

**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)



DCM010-13  
Ed. 01/2015

## FSH ELISA

para análisis de rutina

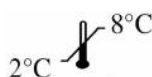
Determinación inmunoenzimática directa de la hormona estimulante del folículo (FSH) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO010

### USO PREVISTO

El kit FSH ELISA Diametra es un método inmunoenzimático directo en fase sólida para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante del folículo (FSH) en suero o plasma humano.

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

### 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La hormona estimulante del folículo (FSH) es una glicoproteína compuesta por 2 subunidades con una masa molecular de aproximadamente 35,500 dalton. La subunidad α es similar a la de las otras hormonas pituitarias [hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y gonadotropina coriónica (HCG)], mientras que la subunidad β es única. La subunidad β confiere a la molécula la actividad biológica. La estimulación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) provoca las liberaciones de FSH y LH de la glándula pituitaria, y estas son transportadas por la sangre a los lugares donde actúan, es decir, los testículos y los ovarios.

En los hombres, la FSH actúa en las células de Sertoli de los testículos, estimulando la síntesis de inhibina, que parece inhibir específicamente una secreción posterior de FSH y de la proteína de unión de andrógenos. Por lo tanto, indirectamente promueve la espermatogénesis. En las mujeres, la FSH actúa en las células granulosas de los ovarios, estimulando la esteroidogénesis. Todos los ciclos menstruales con ovulación tienen una secuencia característica de secreción de FSH y LH. El ciclo menstrual se divide en fase folicular y fase lútea por el impulso que se produce en la mitad del ciclo de las gonadotropinas (LH y FSH). Con el avance de la fase folicular, la concentración de FSH disminuye. Al aproximarse el momento de la ovulación, aproximadamente a la mitad del ciclo, la FSH alcanza el nivel máximo (con una entidad menor que la LH). La utilidad clínica de la determinación de la hormona estimulante del folículo (FSH) en la evaluación de la homeostasis de la regulación de la fertilidad a través del eje hipotálamo-pituitario-gonadal ha sido ampliamente demostrada (1,2).

### 2. PRINCIPIO DEL ENSAYO

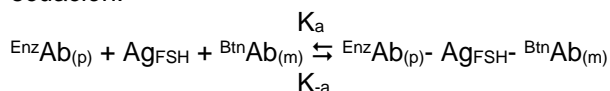
Los reactivos esenciales requeridos para el ensayo inmunoenzimático incluyen anticuerpos con alta

afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados) con reconocimiento de epítopos distintos, en exceso, y antígeno nativo.

En este procedimiento, la inmovilización se produce durante el ensayo en la superficie de los pocillos de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina fijada en los pocillos y el anticuerpo anti-LH biotinilado añadido.

Mezclando el anticuerpo biotinilado, el anticuerpo conjugado con enzima y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

$\text{Ag}_{\text{FSH}}$  = antígeno FSH nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

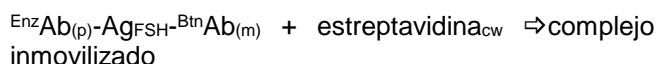
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{FSH}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

$\text{K}_a$  = constante de asociación

$\text{K}_{-a}$  = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se fija en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado.

Esta interacción se describe a continuación:



$\text{Estreptavidina}_{\text{cw}}$  = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

Complejo inmovilizado = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

Tras lograr el equilibrio, la fracción de antígeno unida al anticuerpo se separa del antígeno libre mediante un lavado.

La actividad enzimática de la fracción unida es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

Usando distintos sueros de referencia con valores conocidos de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración del antígeno de muestras desconocidas.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

##### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF	DCE002/1006-0
CAL1	REF	DCE002/1007-0
CAL2	REF	DCE002/1008-0
CAL3	REF	DCE002/1009-0
CAL4	REF	DCE002/1010-0
CAL5	REF	DCE002/1011-0

##### 2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/1003-0

##### 3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo anti FSH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

Anticuerpo anti FSH biotilnilado

REF DCE002/1002-0

##### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/1003-0

##### 5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0,26 g/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

##### 6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar 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.

Llevar 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, la microplaca se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada.

### 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<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/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 FSH de 5 mIU/mL a 100 mIU/mL.

### 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 la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.

- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de Parada. Tanto el sustrato como la solución de Parada 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>5</sub>)

Los Calibradores son listos para usar, son calibrados frente al Estándar Internacional WHO 2<sup>a</sup> IRP 78/549, y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
mIU/mL	0	5	10	25	50	100

Para muestras con una concentración superior a 100 mIU/mL, diluir la muestra 1:2 con el Calibrador 0. Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "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 a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

### 6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras séricas o plasmáticas.

**Nota:** no se recomienda el uso de EDTA-plasma, ya que puede interferir con el ensayo.

Observar las precauciones habituales en la toma de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2÷8°C durante un período máximo de 5 días. Si no

se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Si el ensayo se realiza por duplicado, se requieren 0,100 mL de la muestra.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Muestras /Control		50 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lavar los pocillos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	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 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 dentro de los 5 minutos.			



## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar los controles internos a niveles de los rangos bajo, medio y alto para supervisar el rendimiento del ensayo. Estos controles deben tratarse como muestras desconocidas y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden indicar un cambio inadvertido en las condiciones experimentales o la degradación de los reactivos del kit. Se deben usar reactivos frescos para determinar la causa de las variaciones.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Absorbancia media

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

### 8.2. Curva de calibración

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

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES ESPERADOS

Los intervalos de referencia se indican en la siguiente tabla:

	FSH (mIU/mL)
<b>HOMBRES</b>	1 – 14
<b>MUJERES:</b>	
Fase folicular	3 – 12
Fase ovulatoria	8 – 22
Fase lútea	2 – 12
Menopausia	35 – 151

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. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- **Para uso diagnóstico considerar los valores de FSH junto con otros datos disponibles para el médico.** Seguir las notas de procedimiento y realizar el ensayo con cuidado para obtener resultados válidos. Cualquier modificación del procedimiento podría alterar los resultados. La FSH depende de varios factores distintos de la homeostasis pituitaria. Por lo tanto, la determinación de FSH por sí sola no puede proporcionar un cuadro clínico completo del estado del paciente.
- La hormona FSH es suprimida por los estrógenos, pero en mujeres que toman anticonceptivos orales, los niveles pueden ser bajos o normales. Dietas demasiado radicales y pérdidas de peso pueden reducir la concentración de gonadotropina
- En muestras de pacientes con niveles altos de FSH se puede producir el efecto gancho, por lo que pueden presentar paradójicamente valores bajos de absorbancia. Se recomienda diluir 1:100 con el calibrador 0 y volver a medir (multiplicar el resultado por 100). Sin embargo, se ha observado que valores de hasta 2000 mIU/mL han tenido una absorbancia mayor que la del calibrador más alto.
- Los pacientes que reciben preparaciones de anticuerpos monoclonales murinos para el diagnóstico de la terapia pueden presentar anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) y, por lo tanto, dar resultados falsos positivos o falsos negativos.

## 11. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

### 11.1. Precisión

#### 11.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos en una única sesión de análisis. La variabilidad intraensayo es  $\leq 9,7\%$ .

#### 11.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es  $\leq 8,0$ .

### 11.2. Correlación

El kit FSH (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 35 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 0,91 * (\text{ensayo comercial}) + 3,41$$
$$r^2 = 0,969$$

El kit FSH Diametra (Y) se ha comparado con el kit FSH Diametra del método anterior (X). Se probaron 60 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 1,01 * X - 0,44$$
$$r^2 = 0,953$$

### 11.3. Sensibilidad

La concentración mínima de FSH medible que puede ser distinta del Calibrador 0 es 0,17 mIU/mL.



#### 11.4. Especificidad

La reactividad cruzada del kit FSH Diametra a las sustancias potencialmente interferentes se estimó mediante la adición de estas sustancias, en concentraciones diferentes, a una matriz de suero. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la concentración de la sustancia interferente y la concentración de FSH necesaria para producir la misma DO.

Sustancia comprobada	Reactividad cruzada	Concentración
FSH	100,0%	---
HCG	N.D.	5000 mIU/mL
LH	N.D.	400 mIU/mL
Prolactin	N.D.	2000 ng/mL
TSH	N.D.	1000 mIU/L

#### 11.5. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 3 – 6 – 12 – 24 mIU/mL de FSH ha dado un valor medio ( $\pm$ DE) de 97.83%  $\pm$  8.52%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 veces con Calibrador 0 dio una media ( $\pm$  DE) de 105.54%  $\pm$  5.36%.

#### 12. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

#### BIBLIOGRAFÍA

- Odell, W.D., Parlow, A.F., et al, *J Clin Invest*, 47, 2551 (1981).
- Saxema, B.B., Demura, H.M., et al, *J Clin Endocrinol Metab.*, 28, 59 (1968).
- Wennink JM, Delemarre-van de Waal HA, Schoemaker R, Schoemaker H, Schoemaker J. 1990 Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion patterns in girls throughout puberty measured using highly sensitive immunoradiometric assays. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 33:333–344.
- Winter JS, Faiman C. 1973 The development of cyclic pituitarygonadal function in adolescent females. *J Clin Endocrinol Metab*. 37:714–718.
- Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E 1997 The follicle stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 18:739–773.
- Vitt UA, Kloosterboer HJ, Rose UM, Mulders JW, Kiesel PS, Bete S, Nayudu PL 1998 Isoforms of human recombinant folliclestimulating hormone: comparison of effects on murine follicle development *in vitro*. *Biol Reprod* 59:854–861.
- Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, Gray MR, McDonough PG, Reindollar RH, Jameson JL 1997 Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the folliclestimulating hormone  $\beta$  subunit gene. *N Engl J Med* 337:607–611.
- Robertson DR 1991 Circulating half-lives of follicle stimulating hormones and luteinizing hormone in pituitary extracts and isoform fractions of

ovariectomized and intact ewes. *Endocrinology* 129:1805– 1813.

- Wide L 1981 Electrophoretic and gel chromatographic analyses of follicle stimulating hormone in human serum. *Ups J Med Sci* 86:249–258.
- Berger P, Bidart JM, Delves PS, Dirnhofer S, Hoermann R, Isaacs N, Jackson A, Klonisch T, Laphorn A, Lund T, Mann K, Roitt I, Schwarz S, Wick G 1996 Immunochemical mapping of gonadotropins. *Mol Cell Endocrinol* 125:33–43.

Ed. 01/2015

DCM010-13

**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)

	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



DCM011-12  
Ed. 01/2015

# PROLACTIN ELISA

per analisi di routine

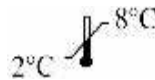
Determinazione immunoenzimatica diretta della Prolattina nel siero umano.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO011

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione della Prolattina nel siero umano.

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

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

La prolattina è un ormone polipeptidico sintetizzato e secreto dall'adeno-ipofisi (ghiandola pituitaria anteriore) e dalla placenta. Inoltre è prodotta in altri tessuti compresi il seno e la decidua. La secrezione pituitaria della prolattina è regolata dai neuroni neurosecretori della dopamina del nucleo arcuato, che inibiscono la secrezione della prolattina.

La prolattina è presente in parecchi fluidi fisiologici, compreso il plasma sanguigno, liquido amniotico, latte, secrezioni mucose e liquido cerebrospinale. La prolattina ha molti effetti, il principale è la stimolazione delle ghiandole mammarie per la produzione di latte (lattazione). Altre funzioni della prolattina includono la sintesi dell'agente tensioattivo dei polmoni fetali alla conclusione della gravidanza e dell'immuno-tolleranza del feto dall'organismo materno durante la gravidanza.

La prolattina può anche avere effetti inibitori sulla funzione gonadica una volta presente in alte concentrazioni.

La secrezione della prolattina presenta una regolarità ciclica giornaliera.

Durante la gravidanza, le alte concentrazioni di estrogeno circolante promuovono la sintesi della prolattina. Livelli elevati risultanti dalla secrezione della prolattina causano la maturazione delle ghiandole mammarie per la lattazione. Dopo il parto, i livelli della prolattina decadono poiché lo stimolo interno è rimosso.

Livelli elevati di prolattina tendono a sopprimere il ciclo ovulatorio inibendo la secrezione sia di FSH che di GnRH.

I livelli della prolattina possono essere controllati come componente di un workup degli ormoni sessuali, poiché la secrezione elevata di prolattina può sopprimere la secrezione di FSH e di GnRH, che conduce all'ipogonadismo ed, a volte, a disfunzioni erettili negli uomini.

Elevate concentrazioni di prolattina nel plasma si presentano durante ovulazione, la gravidanza e lo

sfuerzo. Livelli normali di prolattina nel plasma (iperprolattinemia) possono accadere come conseguenza degli adenomi pituitari, di altre anomalie anatomiche e traumatiche, in risposta a determinati agenti farmacologici e nell'ipotiroidismo.

L'ipoprolattinemia (bassi livelli della prolattina) è stata osservata in casi di ipopituitarismo.

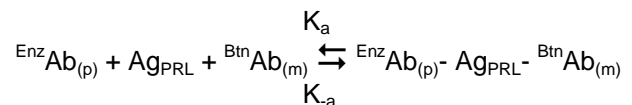
## 2. PRINCIPIO DEL METODO

I reagenti essenziali richiesti per il test immunoenzimatico includono anticorpi ad alta affinità e specificità (coniugati con enzima e immobilizzati) con riconoscimento di epitopi diversi e distinti, in eccesso, e antigene nativo.

In questo procedimento l'immobilizzazione si verifica durante il test sulla superficie dei pozzetti della micropietra attraverso l'interazione della streptavidina fissata sui pozzetti e dell'anticorpo anti-PRL biotinilato aggiunto.

Mescolando l'anticorpo biotinilato, l'anticorpo coniugato con enzima e un siero contenente l'antigene nativo, si verifica la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi, senza competizione e ingombro sterico, per formare un complesso sandwich solubile.

L'interazione è illustrata dall'equazione seguente:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Anticorpo monoclonale biotinilato (quantità in eccesso)

$\text{Ag}_{\text{PRL}}$  = Antigene PRL nativo (quantità variabile)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = Anticorpo policlonale marcato con enzima (quantità in eccesso)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Complesso sandwich Antigene-Anticorpi

$K_a$  = Costante di associazione

$K_{-a}$  = Costante di dissociazione

Contemporaneamente il complesso si fissa sul pozzetto tramite la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato.

Questa interazione è descritta di seguito:

$\text{EnzAb}_{(p)}\text{-Ag}_{\text{PRL}}\text{-}^{\text{Bln}}\text{Ab}_{(m)} + \text{Streptavidin}_{\text{CW}} \Rightarrow \text{Immobilized complex}$

$\text{Streptavidin}_{\text{CW}} = \text{Streptavidina immobilizzata sul pozzetto}$

$\text{Immobilized complex} = \text{Complesso sandwich Antigene-Anticorpi}$

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione di Antigene legata all'anticorpo viene separata dall'antigene libero per decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica della frazione legata è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo. Utilizzando diversi sieri di riferimento con valori noti di antigene è possibile costruire una curva dose-risposta sulla quale determinare la concentrazione dell'antigene di campioni ignoti.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

##### 1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/1106-0
CAL1	REF	DCE002/1107-0
CAL2	REF	DCE002/1108-0
CAL3	REF	DCE002/1109-0
CAL4	REF	DCE002/1110-0
CAL5	REF	DCE002/1111-0

##### 2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del controllo è riportata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/1103-0

##### 3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpi Anti Prolattina coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e Anti Prolattina biotinilato

REF DCE002/1102-0

##### 4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Streptavidina adsorbita nella micropiastra

REF DCE002/1103-0

##### 5. 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

##### 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 e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

#### Note

Conservare tutti i reattivi a 20°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 strips 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<sup>R</sup> 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/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 Prolattina da 5,0 ng/mL a 100,0 ng/mL.

### 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 3<sup>rd</sup> IS 84/500 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	100

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

### 6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (10X) 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.

### 6.3. Preparazione del campione

La determinazione della Prolattina si effettua su siero umano. **Non utilizzare plasma per questo dosaggio** (l'utilizzo di plasma può portare a valori alterati del dosaggio).

Non usare campioni emolizzati, itterici o lipemici. Per ottenere il siero, raccogliere il sangue venoso, far coagulare, infine separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata.

I campioni possono essere conservati per brevi periodi (massimo due giorni) a 2-8°C. Per periodi di conservazione più lunghi congelare a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento. I campioni congelati devono essere miscelati molto bene prima dell'uso.

Per campioni con concentrazione superiore a 100 ng/mL diluire il campione 1:2 con il Calibratore 0. Il Controllo è pronto all'uso.

## 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagenti	Calibratore	Campioni/ Controllo	Bianco
Campioni/ Controllo		50 µL	
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Coniugato	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di soluzione di lavaggio 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 capovolta su fogli di carta assorbente.			
<b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrato	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 QUALITÀ

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Prolattina 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 del kit. Devono essere usati reagenti freschi per determinare la ragione 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>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (Em) in funzione delle concentrazioni degli calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) (es: Four Parameter Logistic o Sigmoide).

### 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

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range basandosi sulla popolazione dei pazienti.

I valori serici di Prolattina sono compresi nei seguenti intervalli:

Campioni	Range ng/mL	
Uomini	1,8 - 17,0	
Donne:	ciclo mestruale	1,2 - 19,5
	Menopausa	1,5 - 18,5

Alcuni campioni femminili testati in questo gruppo probabilmente usano contraccettivi orali, che possono aver influenzato i risultati.

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 tre differenti sieri di controllo.

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	20	5,33	0,15	2,78%
Level 2	20	18,21	0,73	4,03%
Level 3	20	37,20	1,38	3,71%

#### 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.

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	10	5,46	0,30	5,49%
Level 2	10	17,72	0,91	5,16%
Level 3	10	36,29	1,67	4,60%

### 10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di Prolattina misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,12 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 3,13 - 6,25 - 12,50 - 25,00 - 50,00 ng/mL di Prolattina, ha dato un valore medio (±SD) di 102,52% ± 9,75%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 - 16 volte ha dato un valore medio (± SD) di 102,19% ± 9,80%.

### 10.4. Specificità

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

hProlactin	100%
LH	N.D.
FSH	N.D.
hCG	N.D.
TSH	N.D.
hGH	N.D.

### 10.5. Correlazione

Il kit Prolactin ELISA Diametra (y) è stato comparato con un kit disponibile in commercio (x). Sono stati testati i campioni di siero di 37 soggetti.

La curva di regressione è:

$$y = 1,01 x + 1,94$$

$$r^2 = 0,957$$

Il nuovo kit Prolactin ELISA Diametra (y) è stato comparato con il vecchio kit Prolactin Diametra (x). Sono stati testati i campioni di siero di 37 soggetti.

La curva di regressione è:

$$y = 0,85 x + 2,58$$

$$r^2 = 0,937$$



### 10.6. Effetto Hook

Il kit Prolactin ELISA Diametra non presenta effetto Hook fino a 200 ng/mL.

### 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

---

### BIBLIOGRAFIA

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 203 (1974).
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 203 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

Ed. 01/2015

DCM011-12

**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)



DCM011-12  
Ed. 01/2015

# PROLACTIN ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Prolactin in human serum.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO011

## INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Prolactin concentration in human serum.

Prolactin ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prolactin is a polypeptide hormone synthesized and secreted by the Adenohypophysis (anterior Pituitary gland) and the placenta. It is also produced in other tissues including the breast and the decidua. Pituitary prolactin secretion is regulated by neuroendocrine neurons in the hypothalamus, most importantly by neurosecretory dopamine neurons of the arcuate nucleus, which inhibit prolactin secretion.

Prolactin is present in several body fluids, including blood plasma, amniotic fluid, milk, mucosal secretions and cerebrospinal fluid.

Prolactin has many effects, the most important of which is to stimulate the mammary glands to produce milk (lactation). Other possible functions of prolactin include the surfactant synthesis of the fetal lungs at the end of the pregnancy and immune tolerance of the foetus by the maternal organism during pregnancy.

Prolactin may also have inhibitory effects on gonadal function when present in high concentrations.

There is a diurnal cycle in prolactin secretion.

During pregnancy, high circulating concentrations of estrogen promote prolactin production. The resulting high levels of prolactin secretion cause maturation of the mammary glands, preparing them for lactation. After childbirth, prolactin levels fall as the internal stimulus for them is removed.

High prolactin levels also tend to suppress the ovulatory cycle by inhibiting the secretion of both FSH and GnRH.

Prolactin levels may be checked as part of a sex hormone workup, as elevated prolactin secretion can suppress the secretion of FSH and GnRH, leading to hypogonadism, and sometimes causing erectile dysfunction in men.

Elevations in plasma prolactin concentrations occur during ovulation, pregnancy, nursing and stress. Abnormal elevations in plasma prolactin levels (hyperprolactinemia) can occur as a result of pituitary adenomas, other anatomic and traumatic

abnormalities, in response to certain pharmacologic agents and in hypothyroidism.

Hypoprolactinemia (low prolactin levels) are observed in cases of hypopituitarism.

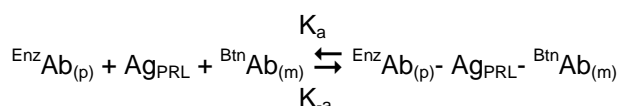
## 2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this procedure the immobilization takes place during the assay at the surface of a microplate well through the interaction of streptavidin coated on the well and exogenously added biotinylated monoclonal anti-PRL antibody.

Upon mixing monoclonal biotinylated antibody, the enzyme labeled antibody and a serum containing the native antigen, a reaction results between the native antigen and the antibodies without competition or steric hindrance to form a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess quantity)

$\text{Ag}_{\text{PRL}}$  = Native PRL antigen (variable quantity)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = Enzyme labeled polyclonal antibody (Excess quantity)

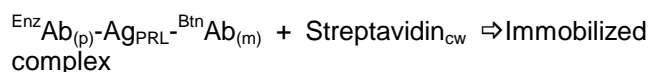
$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = Antigen-Antibodies Sandwich complex

$\text{K}_a$  = Rate constant of association

$\text{K}_a$  = Rate constant of disassociation

Simultaneously the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody.

This interaction is illustrated below:



Streptavidin<sub>cw</sub> = Streptavidin immobilized on well  
Immobilized complex = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. By using several different serum references of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	<b>REF</b>	<b>DCE002/1106-0</b>
CAL1	<b>REF</b>	<b>DCE002/1107-0</b>
CAL2	<b>REF</b>	<b>DCE002/1108-0</b>
CAL3	<b>REF</b>	<b>DCE002/1109-0</b>
CAL4	<b>REF</b>	<b>DCE002/1110-0</b>
CAL5	<b>REF</b>	<b>DCE002/1111-0</b>

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Control Concentration is indicated on the Certificate of Analysis **REF** **DCE045/1103-0**

##### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibodies Anti Prolactin conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and Anti Prolactin biotinylated **REF** **DCE002/1102-0**

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Streptavidin adsorbed on microplate **REF** **DCE002/1103-0**

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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 at 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<sup>R</sup> as preservative. 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/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 Prolactin from 5.0 to 100.0 ng/mL.

### 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against WHO 3<sup>rd</sup> IS 84/500 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	100

The Calibrators are stable until the expiry date printed on the label. Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C.

### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (10X) with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C. In concentrated wash solution is possible to observe the presence of crystals; in this case mix at room temperature until 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.

### 6.3. Preparation of the Sample

Prolactin determination can be done on human serum. **Do not use plasma for this assay** (plasma samples can lead to false results).

Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.

To obtain the serum, collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred.

Specimen can be stored at 2÷8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

For sample with concentration over 100 ng/mL dilute the sample 1:2 with Calibrator 0.

The Control is ready for use.

### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		50 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well; wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> 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 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 Prolactin 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the values of absorbance (Em) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (Es: Four Parameter Logistic or Sigmoide).

### 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

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population.

The serum Prolactin values are comprised in the following intervals:

Sample		Range ng/mL
Male		1.8 - 17.0
Female:	menstrual cycle	1.2 - 19.5
	menopause	1.5 - 18.5

Some of the female population tested in this group were probably using oral contraceptives, which may affect results.

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 (20x) the measurement of three different control sera in one assay.

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	20	5.33	0.15	2.78%
Level 2	20	18.21	0.73	4.03%
Level 3	20	37.20	1.38	3.71%

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera with kits of different lots.

Sample	N	X	σ	C.V.
Level 1	10	5.46	0.30	5.49%
Level 2	10	17.72	0.91	5.16%
Level 3	10	36.29	1.67	4.60%

### 10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Prolactin that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.12 ng/mL at the 95 % confidence limit.

### 10.3. Accuracy

The recovery of 3,13 - 6,25 - 12,50 - 25,00 - 50,00 ng/mL of Prolactin added to sample gave an average value (±SD) of 102.52% ± 9.75% with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 - 16 times gave an average value (±SD) of 102.19% ± 9.80%.

### 10.4. Specificity

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

hProlactin	100%
LH	N.D.
FSH	N.D.
hCG	N.D.
TSH	N.D.
hGH	N.D.

### 10.5. Correlation

Diametra Prolactin ELISA kit (y) was compared to another commercially available Prolactin assay (x). Serum samples of 37 subjects were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.01 x + 1.94$$

$$r^2 = 0.957$$

The new Diametra Prolactin ELISA kit (y) was compared to the old Diametra Prolactin ELISA kit (x). Serum samples of 37 subjects were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.85 x + 2.58$$

$$r^2 = 0.937$$

### 10.6. Hook Effect

Diametra Prolactin assay shows no Hook effect up to 200 ng/mL.

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## **BIBLIOGRAPHY**

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 202 (1974).
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 203 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methods, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

**Ed. 01/2015**

**DCM011-12**

**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)



DCM011-12  
Ed. 01/2015

# PROLACTIN ELISA

para análisis de rutina

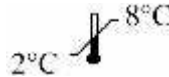
Determinación inmunoenzimática directa de la prolactina en suero humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO011

## USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de prolactina en suero humano.

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

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La prolactina es una hormona polipeptídica sintetizada y secretada por la adenohipófisis (glándula pituitaria anterior) y la placenta. También se produce en otros tejidos, incluyendo el pecho y la decidua. La secreción pituitaria de prolactina está regulada por las neuronas neurosecretoras de dopamina del núcleo arqueado, que inhiben la secreción de prolactina.

La prolactina está presente en varios fluidos fisiológicos, incluyendo el plasma sanguíneo, el líquido amniótico, la leche, las secreciones mucosas y el líquido cefalorraquídeo. La prolactina tiene numerosos efectos, el principal es la estimulación de las glándulas mamarias para la producción de leche (lactancia). Entre otras funciones de la prolactina se incluyen la síntesis del agente tensioactivo de los pulmones fetales al final del embarazo y de la inmunotolerancia del feto del organismo materno durante el embarazo.

La prolactina también puede tener efectos inhibidores sobre la función de las gonadas cuando está presente en altas concentraciones.

La secreción de la prolactina presenta una regularidad cíclica diaria.

Durante el embarazo, las altas concentraciones de estrógeno circulante promueven la síntesis de prolactina. Los niveles elevados resultantes de la secreción de prolactina causan la maduración de las glándulas mamarias para la lactancia. Después del parto, los niveles de prolactina disminuyen puesto que el estímulo interno desaparece.

Los niveles elevados de prolactina tienden a suprimir el ciclo ovulatorio inhibiendo la secreción de FSH o de GnRH.

Los niveles de prolactina se pueden controlar como componente de un diagnóstico diferencial de las hormonas sexuales, puesto que la secreción elevada de prolactina puede suprimir la secreción de FSH y de GnRH, dando lugar a hipogonadismo y, en ocasiones, a disfunción eréctil en los hombres.

Se presentan altas concentraciones de prolactina en el plasma durante la ovulación, el embarazo y el estrés. Niveles normales de prolactina en plasma (hiperprolactinemia) pueden aparecer como consecuencia de adenomas pituitarios, de otras anomalías anatómicas y traumáticas, como respuesta a determinados agentes farmacológicos y en el hipotiroidismo. Se ha observado hipoprolactinemia (bajos niveles de prolactina) en casos de hipopituitarismo.

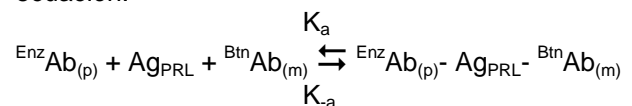
## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los reactivos esenciales requeridos para el ensayo inmunoenzimático incluyen anticuerpos con alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados) con reconocimiento de epítopos distintos, en exceso, y antígeno nativo.

En este procedimiento, la inmovilización se produce durante el ensayo en la superficie de los pocillos de la microplaca mediante la interacción de la estreptavidina fijada en los pocillos y el anticuerpo anti-PRL biotinilado añadido.

Mezclando el anticuerpo biotinilado, el anticuerpo conjugado con enzima y un suero que contiene el antígeno nativo, se produce la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos, sin competencia o impedimento estérico, para formar un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



$\text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = anticuerpo biotinilado monoclonal (cantidad en exceso)

$\text{Ag}_{\text{PRL}}$  = antígeno PRL nativo (cantidad variable)

$\text{EnzAb}_{(p)}$  = anticuerpo policlonal marcado con enzima (cantidad en exceso)

$\text{EnzAb}_{(p)} - \text{Ag}_{\text{PRL}} - \text{B}^{\text{tn}}\text{Ab}_{(m)}$  = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

$\text{K}_a$  = constante de asociación

$\text{K}_{-a}$  = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se fija en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado.

Esta interacción se describe a continuación:

$\text{EnzAb}_{(p)}\text{-Ag}_{\text{PRL}}\text{-}^{\text{Btn}}\text{Ab}_{(m)} + \text{estreptavidina}_{\text{cw}} \Rightarrow \text{complejo inmovilizado}$

$\text{Estreptavidina}_{\text{cw}} = \text{estreptavidina inmovilizada en el pocillo}$

$\text{Complejo inmovilizado} = \text{complejo sándwich antígeno-anticuerpos}$

Tras lograr el equilibrio, la fracción de antígeno unida al anticuerpo se separa del antígeno libre mediante decantación o aspiración.

La actividad enzimática de la fracción unida es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo.

Usando distintos sueros de referencia con valores conocidos de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración del antígeno de muestras desconocidas.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/1106-0
CAL1	REF DCE002/1107-0
CAL2	REF DCE002/1108-0
CAL3	REF DCE002/1109-0
CAL4	REF DCE002/1110-0
CAL5	REF DCE002/1111-0

2. Control (1 frascos, 1 mL)

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

REF DCE045/1103-0

3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpos anti-prolactina conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anti-prolactina biotinilado

REF DCE002/1102-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/1103-0

5. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)

$\text{H}_2\text{O}_2$  -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar 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 20±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.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/ $\text{H}_2\text{O}_2$  a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de prolactina de 5,0 ng/mL a 100,0 ng/mL.

### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada 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>5</sub>)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al WHO 3<sup>rd</sup> IS 84/500, y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	100

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

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "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 a 500 mL, teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

### 6.3. Preparación de la muestra

La determinación de la prolactina se realiza en suero humano. **No utilizar plasma.**

No use muestras con contaminación microbiana, altamente lipémicas o hemolizadas. La obtención de la muestra es por extracción de sangre venosa, dejar

coagular y separar por centrifugado, recuperar el suero.

Si la dosificación no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20°C. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 100 ng/mL, diluir 1:2 la muestra con Calibrador 0.

El Control está listo para usar.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivos	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Muestras /Control		50 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	50 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Retirar la mezcla de reacción, lavar 3 veces añadiendo a cada pocillo 0,3 mL de solución de lavado diluida. <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 golpéeela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Substrato TMB	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 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 dentro de los 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de prolactina 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 absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (Em) en función de las concentraciones de los calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) (p. ej.: logística de cuatro parámetros o sigmoideo).

### 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

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Los valores séricos de prolactina se incluyen en los siguientes intervalos:

Muestras	Rango ng/mL
<b>Hombres</b>	1,8 - 17,0
<b>Mujeres:</b>	ciclo menstrual 1,2 - 19,5
	Menopausia 1,5 - 18,5

Algunas muestras femeninas comprobadas en este grupo probablemente usan anticonceptivos orales que pueden haber influido en los resultados.

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 de control distintos.

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	20	5.33	0.15	2.78%
Nivel 2	20	18.21	0.73	4.03%
Nivel 3	20	37.20	1.38	3.71%

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos.

Muestra	N	X	σ	C.V.
Nivel 1	10	5.46	0.30	5.49%
Nivel 2	10	17.72	0.91	5.16%
Nivel 3	10	36.29	1.67	4.60%

### 10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de prolactina medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,12 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.3. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra enriquecida con 3.13 - 6.25 - 12.50 - 25.00 - 50.00 ng/mL de prolactina ha dado un valor medio (±DE) de 102.52% ± 9.75%.

La prueba de dilución conductada en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces dio una media (± DE) de 102.19% ± 9.80%.

### 10.4. Especificidad

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

h. prolactina	100%
LH	N.D.
FSH	N.D.
hCG	N.D.
TSH	N.D.
hGH	N.D.

### 10.5. Correlación

El kit Prolactin ELISA (Diametra) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 37 muestras de suero.

La curva de regresión es:

$$\text{Diametra} = 1.01 * (\text{ensayo comercial}) + 1.94$$
$$r^2 = 0,957$$

El kit Prolactin ELISA Diametra (Y) se ha comparado con el kit Prolactin ELISA Diametra del método anterior (X). Se probaron 37 muestras de suero.

La curva de regresión es la siguiente:

$$Y = 0,85 * X + 2.58$$
$$r^2 = 0,937$$

### 10.6. Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 200 mIU/mL.

### 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

### BIBLIOGRAFÍA

- Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
- Shome, B. and Parlow, A.F., J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199 – 205 (1974).
- Uotila, M. Ruoslahti, E. Engvall, E., J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
- Acosta, A.A.M.D. and Wright, G.L., Journal of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983).
- Cohen, K. L., Metabolism, 26 1165-1177 (1977)

**Ed. 01/2015**

**DCM011-12**

**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)

	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



DCM012-12  
Ed. 01/2015

## AFP ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'AFP nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO012

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'AFP in siero o plasma umano.

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

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'alfa Fetoprotein (AFP) è una glicoproteina di 68 kDa, che normalmente è prodotta soltanto nel feto durante lo sviluppo. È prodotto dal sacco vitellino e dal fegato del feto.

I livelli di AFP diminuiscono presto dopo la nascita e probabilmente non ha alcuna funzione in adulti normali. Lega l'estradiolo per impedirne l'accesso al cervello fetale. La misurazione durante la gravidanza è utile per rilevare determinate anomalie – in particolare, se sono presenti livelli elevati di AFP nel liquido amniotico, questi possono indicare un difetto inerente allo sviluppo nel bambino.

In pazienti non gravide un tumore può produrre AFP, quindi può essere usato come tumour marker. AFP è l'indicatore principale (con HCG) del cancro testicolare e i livelli durante il trattamento possono influenzare la cura.

Come tutti gli indicatori del tumore, la rilevazione di AFP da solo non diagnostica un tumore; in questo caso, se è rilevato è certamente consigliabile indagare la malattia che induce la presenza di AFP. Gli indicatori tumorali sono impiegati per valutare il successo del trattamento (ad esempio chemioterapia), se i livelli di AFP diminuiscono, è un'indicazione che la malattia sta regredendo. Nuove ricerche segnalano, che un'isoforma di AFP che lega l'agglutinina *Lens culinaris* (AFP-L3) può essere particolarmente utile nell'identificazione precoce dei tumori aggressivi connessi con il carcinoma epatocellulare (HCC).

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

L'AFP ELISA test è basato sulla cattura simultanea dell'AFP umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente l'enzima HRP presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ed il

TMB Substrate, sviluppa 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 proporzionale alla concentrazione di AFP presente nel campione.

La concentrazione dell'AFP nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONI

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0

REF DCE002/1206-0

CAL1

REF DCE002/1207-0

CAL2

REF DCE002/1208-0

CAL3

REF DCE002/1209-0

CAL4

REF DCE002/1210-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/1203-0

3. Incubation Buffer (1 flacone, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4, BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo anti AFP monoclonale coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/1202-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti AFP monoclonale adsorbito sulla micropiastra

REF DCE002/1203-0

6. 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

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 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 20±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 strips 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<sup>R</sup> come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- 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 reattivi devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- 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 AFP da 5 ng/mL a 200 ng/mL.

## 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1<sup>st</sup> IS 72/225, ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	5	20	80	200

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

### 6.2. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare immediatamente prima dell'uso.

Aggiungere 10 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 3). La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test da eseguire.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante.

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

### 6.3. Preparazione del Campione

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

I campioni possono essere conservati a 2-8°C per brevi periodi (massimo due giorni). Per tempi di



conservazione più lunghi congelare i campioni a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento. Per campioni con concentrazione superiore a 200 ng/mL diluire il campione con Incubation buffer. Il Controllo è pronto all'uso.

#### 6.4. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

#### 6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco

Reagente	Calibratori	Campione /Controllo	Bianco
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Campione /Controllo		25 µL	
Coniugato Diluito	50 µL	50 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22±28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare 3 volte aggiungendo in ogni pozzetto 0,3 mL di soluzione di lavaggio 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> 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 AFP 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 (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio condotto su adulti apparentemente sani usando l'AFP Diametra, sono stati riscontrati i seguenti risultati:

Popolazione	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
Uomini	82	2	1
Donne	55	1	1

In uno studio condotto con il kit AFP Diametra in pazienti con Neoplasia ai testicoli sono stati osservati i seguenti valori:

Popolazione	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
Uomini	4	5	3

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 Fabbrikante 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 tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 6,4%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 6,5%.

### 10.2. Specificità

La cross-reattività del kit AFP ELISA è stata calcolata sulla base dei rapporti di masse:

AFP	100 %
βHCG	0,01 %
HCG	0,01 %
hLH	0,01 %
hFSH	0,01 %
hTSH	0,01 %

### 10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 12,5 – 25 – 50 ng/mL di AFP, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 98,33%  $\pm$  4,43%.

### 10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di AFP misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,35 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Diametra AFP ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 32 donne e 4 uomini.

La curva di regressione è :

$$y = 1,04 x - 0,41$$

$$r = 0,99 (r^2 = 0,98)$$

### 10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 4000 ng/mL.

## 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 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199–202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974

Ed. 01/2015

DCM012-12

**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)



DCM012-12  
Ed. 01/2015

## AFP ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of AFP in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO012

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of AFP concentration in human serum or plasma.

AFP ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Alpha Fetoprotein (AFP) is a 68 kDa glycoprotein, which is normally only produced in the fetus during its development. It is a normally produced by the liver and yolk sac of the fetus.

AFP levels decrease soon after birth and probably has no function in normal adults. It binds the hormone estradiol to keep it from affecting the fetal brain. Its measurement during pregnancy has been useful to detect certain abnormalities - specifically, if high levels of AFP are found in amniotic fluid, it can indicate a developmental defect in the baby.

In some patients who are not pregnant a tumor can produce AFP, thus it can be used as a tumour marker. AFP is the main tumour marker (along with HCG) to diagnose testicular cancer and its values over time can have significant effect on the treatment plan.

Like all tumour markers, the detection of AFP by itself is not diagnostic of anything, although if it is detected it is certainly advisable to rule out the diseases could cause levels to rise. The primary reason tumor markers are used are to measure the success of a treatment (e.g. chemotherapy), if levels of AFP are going down, it is an indication that a disease is improving. New research exhibits that an isoform of AFP which binds *Lens culinaris* agglutinin (AFP-L3) can be particularly useful in early identification of aggressive tumors associated with hepatocellular carcinoma (HCC).

### 2. PRINCIPLE

AFP ELISA test is based on simultaneous binding of human AFP to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the separation bound-free is obtained with a simple solid-phase washing.

Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

The colour intensity is proportional to the AFP concentration in the sample.

The AFP 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 DCE002/1206-0

CAL1 REF DCE002/1207-0

CAL2 REF DCE002/1208-0

CAL3 REF DCE002/1209-0

CAL4 REF DCE002/1210-0

2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis REF DCE045/1203-0

3. Incubation Buffer (1 vial, 50 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Monoclonal anti AFP antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/1202-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal anti AFP antibody adsorbed on microplate REF DCE002/1203-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 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 at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (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<sup>R</sup> as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- 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.
- 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 AFP from 5 ng/mL to 200 ng/mL.

## 5. PRECAUTIONS

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

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

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>4</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO 1<sup>st</sup> IS 72/225 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	5	20	80	200

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 Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL of Conjugate (reagent 4) to 1 mL of Incubation Buffer (reagent 3). The quantity of diluted conjugate is proportional at the number of the tests. Mix gently for 5 minutes, with a rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22±28°C).

### 6.3. Preparation of the Sample

AFP determination should be done in human serum or plasma.

Specimen can be stored at 2±8°C for at short time (max two days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing.

For sample with concentration over 200 ng/mL dilute the sample with Incubation buffer.

The Control is ready to use.

#### 6.4. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

#### 6.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Sample/ Control		25 µL	
Diluted Conjugate	50 µL	50 µL	
Incubate at room temperature (22-28°C) for 1 hour. Remove the contents from each well; wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> 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 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 AFP 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>4</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>4</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. REFERENCE VALUES

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using Diametra AFP, the following results were observed:

Population	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
<b>Males</b>	82	2	1
<b>Females</b>	55	1	1

In a study conducted with nonseminomatous testicular cancer patient using AFP, the following values were observed:

Population	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
<b>Males</b>	4	5	3

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 (16x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is 6.4%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (16x) the measurements of three different control sera in different lots. The between assay variability is 6.5%.

### 10.2. Specificity

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

AFP	100 %
βHCG	0.01 %
HCG	0.01 %
hLH	0.01 %
hFSH	0.01 %
hTSH	0.01 %

### 10.3. Accuracy

The recovery of 12.5 – 25 – 50 ng/mL of AFP added to sample gave an average value ( $\pm$ SD) of 98.33%  $\pm$  4.43% with reference to the original concentrations.

### 10.4. Sensitivity

The lowest detectable concentration of AFP that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.35 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.5. Correlation with RIA

Diametra AFP ELISA was compared to another commercially available AFP assay. Serum samples of 32 females and 4 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.04 x - 0.41$$

$$r = 0.99 (r^2 = 0.98)$$

### 10.6. Hook Effect

The AFP ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 4000 ng/mL.

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

## BIBLIOGRAPHY

1. Wisdom, G.B. Clin. Chem. 22/8 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199–202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974

Ed. 01/2015

DCM012-12

**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)



DCM012-12  
Ed. 01/2015

# AFP ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de AFP en suero o plasma humano

IVD



LOT  
Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO012

## USO PREVISTO

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

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

## 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La alfa fetoproteína (AFP) es una glicoproteína de 68 kDa, que normalmente se produce sólo durante el desarrollo fetal. Es producida por el saco vitelino y el hígado fetal. Los niveles disminuyen poco después de nacer y, probablemente, no tiene ninguna función en los adultos normales. Se une al estradiol para impedir el acceso al cerebro del feto. La medida es útil durante el embarazo para detectar ciertas anomalías - en particular, si hay un alto nivel de AFP en el líquido amniótico, puede ser indicio de un defecto inherente en el desarrollo del niño. En pacientes no embarazadas, un tumor puede producir AFP, por lo que se puede utilizar como marcadores tumorales. AFP es el principal indicador (con GCH) en el cáncer testicular y los niveles durante el tratamiento pueden indicar si el protocolo terapéutico es adecuado.

Al igual que con todos los indicadores de los tumores, la detección de la AFP por sí misma no diagnostica un tumor; si se detectan valores de AFP elevados se recomienda investigar la causa de la elevación. Los marcadores tumorales se utilizan para evaluar el éxito del tratamiento (por ejemplo, quimioterapia), si los niveles de AFP caen, es una indicación de que la enfermedad está en remisión. Una nueva investigación muestra que la isoforma de la AFP que se une a la aglutinina Lens culinaris (AFP-L3) puede ser particularmente útil en la detección precoz de tumores agresivos asociados con carcinoma hepatocelular (HCC).

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba se basa en la captura simultánea de la AFP por dos anticuerpos monoclonales humanos, un inmovilizado en placas de microtitulación y el otro conjugado con peroxidasa de rábano (HRP).

Después de un período de 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 presente en la fracción unida desarrolla una coloración azul que se torna amarilla tras añadir la solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de AFP en la muestra.

La concentración de AFP en la muestra se calcula a partir de 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 DCE002/1206-0

CAL1

REF DCE002/1207-0

CAL2

REF DCE002/1208-0

CAL3

REF DCE002/1209-0

CAL4

REF DCE002/1210-0

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/1203-0

3. Tampón de incubación (1 frasco, 50 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L

REF DCE001/1401-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Anticuerpo anti AFP monoclonal conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/1202-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti AFP monoclonal absorbido en la microplaca

REF DCE002/1203-0

6. 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

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evítese el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. Solución de lavado conc.50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

### 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.

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (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<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- Materiales de origen animal utilizados para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, aun así estos materiales se deben manejar como potencialmente infecciosos.
- 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.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de AFP desde 5 hasta 200 ng/mL.

## 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 la metodología aplicada ha sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el sustrato TMB inicia una reacción cinética que termina al agregar la solución de parada. Tanto el sustrato como la solución de parada 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>4</sub>)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1<sup>st</sup> IS 72/225, y tienen las siguientes concentraciones de AFP:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>
ng/mL	0	5	20	80	200

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

### 6.2. Preparación de conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes de su uso.

Agregar 10 µL de conjugado (reactivo 3) a 1 mL de tampón de incubación (reactivo 2). Prepare la cantidad de conjugado proporcionalmente al número de test que se deben ejecutar.



Mezclar suavemente, dejando al menos 5 minutos en un agitador rotatorio.

Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22÷28°C).

### 6.3 Preparación de la muestra

La determinación de AFP se puede realizar en plasma o suero humano.

Las muestras pueden ser almacenadas a 2-8°C por períodos cortos (hasta dos días), para períodos superiores congele las muestras a -20°C. Evitar los ciclos de descongelación y congelación.

Para muestras con concentraciones superiores a 200 ng/mL diluir la muestra con tampón de incubación.

El Control está listo para usar.

### 6.4 Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL.

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

### 6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>4</sub>	25 µL		
Muestra/ Control		25 µL	
Conjugado diluido	50 µL	50 µL	
<p>Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 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>			

<b>Lavados automático:</b> 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
<p>Agitar suavemente la placa.</p> <p>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.</p>			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar sueros control para los rangos bajo, medio y alto de AFP 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<sub>m</sub>) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) y de cada muestra.

### 8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia (E<sub>m</sub>) en función de las concentraciones de los Calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>). Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3 Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio de los adultos sanos utilizando la AFP Diametra, se encontraron los siguientes resultados:

Población	0-10 ng/mL	20 ng/mL	30 ng/mL
Hombres	82	2	1
Mujeres	55	1	1

En un estudio realizado con el kit AFP Diametra en pacientes con tumor testicular se observaron los siguientes valores

Población	0-10 ng/mL	10-100 ng/mL	>100 ng/mL
Hombres	4	5	3

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 (16x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 6.4%.

#### 10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de suero de control con dos kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 6.5%.

### 10.2 Especificidad

La reactividad cruzada de los kits de ELISA AFP se calculó sobre la base de las relaciones de las masas:

AFP	100 %
βHCG	0,01 %
HCG	0,01 %
hLH	0,01 %
hFSH	0,01 %
hTSH	0,01 %

### 10.3 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12.5 - 25 - 50 ng/mL de AFP ha dado un valor medio ( $\pm$ SE) de 98.33%  $\pm$  4.43%.

### 10.4 Sensibilidad

La concentración de AFP medida que se puede distinguir de Calibrador 0 es de 0,35 ng/mL, con un límite de confianza del 95%.

### 10.5 Correlación

El AFP ELISA fue comparado con otro ensayo comercial de AFP. Se analizaron 32 muestras de suero de mujeres y 4 de hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

$$Y = 1.04 * X - 0.41$$

$$r^2 = 0,98$$

### 10.6 Efecto "Hook"

Este método no afecta "Hook" se observó hasta 4000 ng/mL.

## 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 1243 - 1255 (1976)
2. Shome, B, J. Clin. Endocr. Metab.,39, 199-202 (1974)
3. Uotila, M, J. Immunol. Methds, 42, 11-15 (1981)
4. Acosta, A.A.M.D, J. of Clinical Immunoassays, 6, 41 (1983)
5. Jacobsen Acta Path Microb. Immun. Scand. 91 183- 190 (1983)
6. Kohn J Orr AH, McElwain TJ Lancet 2: 433 – 436 (1976)
7. Waaldmann Cancer 34 1510 – 1515, 1974

Ed. 01/2015

DCM012-12

**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)

	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



DCM013-11  
Ed. 01/2015

## TSH ELISA

per analisi di routine

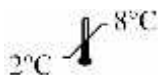
Determinazione immunoenzimatica del TSH in siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO013

### DESTINAZIONE D' USO

Il kit Diametra TSH ELISA viene utilizzato per la determinazione quantitativa dell'ormone stimolante la tiroide (TSH, tiotropina) nel siero o plasma umano. Il kit TSH ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'ormone stimolante la tiroide (TSH) è un ormone glicopolipeptidico sintetizzato e secreto dall'ipofisi anteriore, e regola la funzione endocrina della ghiandola tiroidea.

Il TSH consiste di due subunità, la subunità α è identica a quella della gonadotropina corionica umana (HCG), dell'ormone luteinizzante (LH), dell'ormone follicolo-stimolante (FSH); la subunità β è unica per il TSH e quindi ne determina la funzione.

La produzione di TSH è controllata dal Thyrotropin release hormone, (TRH), che è prodotto nell'ipotalamo ed è trasportato alla ghiandola pituitaria, in cui aumenta la produzione ed il rilascio di TSH. La somatostatina prodotta dall'ipotalamo ha, invece, un effetto opposto sulla produzione pituitaria di TSH, diminuisce o inibisce il relativo rilascio.

Il TSH stimola la ghiandola tiroidea inducendo la secrezione di tirossina (T4) e il triiodotironina (T3). Il rilascio di TSH è regolato dalla frazione libera circolante degli ormoni tiroidei nel sangue.

I livelli di TSH sono diminuiti quando le concentrazioni periferiche della frazione libera degli ormoni tiroidei sono alte. Per contro, livelli elevati di TSH sono presenti quando le concentrazioni periferiche degli ormoni tiroidei sono basse. Questo effetto genera un ciclo a feedback negativo.

I livelli di TSH sono misurati in pazienti sospetti di ipertiroidismo o ipotiroidismo, eccesso o carenza dell'ormone della tiroide. Livelli normali di TSH sono fra 0.3 e 3.0 mIU/mL, ma l'interpretazione dipende dai livelli degli ormoni tiroidei (T3 e T4).

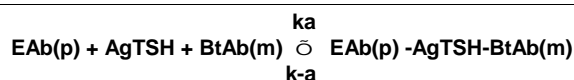
Livelli elevati di TSH uniti a livelli elevati degli ormoni tiroidei (T3 e T4) possono indicare una disfunzione dell'ipotalamo e della ghiandola pituitaria. In questo caso, livelli elevati di TSH sono prodotti spesso da un tumore benigno dell'ipofisi (adenoma). Per contro, livelli bassi di TSH e livelli bassi di T3 e T4 circolanti,

indicano ipopituitarismo. In caso di livelli anormalmente elevati di T3 e T4, dovuti alla sovrapproduzione nella tiroide, il meccanismo a feedback, descritto precedentemente, provoca bassi livelli di TSH. Ciò si presenta in malattie quali ipertiroidismo o la malattia di Grave. Per contro, un ipoproduzione di T3 e T4 causata da malattie quali ipotiroidismo congenito (cretinismo), ipotiroidismo o resistenza dell'ormone tiroideo, provoca un aumento nei livelli di TSH. Chiaramente sia TSH che T3 e T4 dovrebbero essere misurati per accertare quale specifica disfunzione della tiroide è causata dall'ipofisi o dalla tiroide.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

I requisiti essenziali per un saggio immunoenzimatico sono anticorpi ad alta affinità e specificità (enzima coniugato e immobilizzato), con differenti e distinti epitopi.

In questo metodo l'anticorpo si lega alla superficie del pozzetto attraverso l'interazione della streptavidina. Successivamente, nei pozzetti sono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti-TSH monoclonali biotinilati sia anticorpi coniugati all'enzima; entrambi i tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi. Nei pozzetti della micropiastra la reazione tra antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e si forma un complesso sandwich solubile. L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



**BtAb(m)** = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

**AgTSH** = Antigene nativo (Quantità Variabile)

**EAb(p)** = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

**EAb(p)-AgTSH-BtAb(m)** = Complesso Sandwich Antigene- Anticorpo

**ka** = Costante di Associazione

**k-a** = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene depositato sul pozzetto mediante la reazione ad affinità tra la

Streptavidina e l' anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + Streptavidina CW. → Compl. immobilizzato

**Streptavidina CW.**= Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

**Compl. Immobilizzato** = Legame sandwich Anticorpo-Antigene

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo è separata dall'antigene non legato mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima è quantificata mediante una reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (7 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/1306-0
CAL1	REF	DCE002/1307-0
CAL2	REF	DCE002/1308-0
CAL3	REF	DCE002/1309-0
CAL4	REF	DCE002/1310-0
CAL5	REF	DCE002/1311-0
CAL6	REF	DCE002/1312-0

2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata nel Certificato di Analisi **REF DCE045/1303-0**

3. Conjugate (1 flacone, 13 mL)

Anticorpo goat anti TSH coniugato a perossidasi di rafano (HRP), anticorpo mouse anti TSH biotinilato **REF DCE002/1302-0**

4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con streptavidina **REF DCE002/1303-0**

5. 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**

6. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

#### 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 la micropiastra 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<sup>R</sup> 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/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 TSH da 0,2 a 20,0 mIU/L.

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

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 2<sup>nd</sup> IRP 80/558 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	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>
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

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

### 6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

### 6.3. Preparazione del campione

La determinazione del TSH può essere effettuata su siero o plasma umano.

Il campione può essere conservato a 2-8°C per massimo due giorni. Per lunghi periodi di stoccaggio i campioni dovrebbero essere congelati. I campioni congelati devono essere agitate bene dopo lo scongelamento e prima del dosaggio. Evitare ripetuti cicli di congelamento/scongelamento.

Per campioni con concentrazione superiore a 20 mIU/L diluire il campione 1:2 con il Calibratore 0.

Correggere il risultato usando l'appropriato fattore di diluizione.

Il Controllo è pronto all'uso.

### 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 essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>6</sub>	50 µL		
Campione /Controllo		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Coprire la piastra e incubare per 60 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C). Per incrementare la sensibilità prolungare il tempo di incubazione a 120 minuti. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti per 6 volte con 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 capovolta su fogli di carta assorbente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Coprire la piastra ed incubare 20 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 TSH 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. 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 (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione ( $C_0$ - $C_6$ ) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore ( $C_0$ - $C_6$ ) in funzione delle concentrazioni.

Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Cubic Spline o Four Parameter Logistic).

### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

Campioni di siero di donne e uomini sani sono stati saggiati utilizzando il Diametra TSH ELISA test, con i seguenti risultati:

	Media (mIU/L)	Range (mIU/L)
TSH	1,85	0,39 – 6,16

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 4,6%.

#### 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 10,8%.

### 10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L di TSH, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 88,85%  $\pm$  2,62%.

### 10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di TSH misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,01 mIU/L con un limite di confidenza del 95%.

### 10.4. Specificità

La cross-reattività della tirotropina ELISA verso sostanze selezionate è stata valutata aggiungendo sostanze interferenti al siero a concentrazioni differenti. La cross-reattività è stata calcolata mediante il rapporto tra la dose della sostanza interferente e la quantità di TSH necessaria a dare la stessa assorbanza.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alpha (hTSH- )	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH- )	152 %
Follitropina (hFSH)	1,0 %
Ormone luteinizzante(hLH)	1,0 %
GonadotropinaCorionica(hCG)	<0,1 %

### 10.5. Correlazione con altri dosaggi

Il kit Diametra TSH ELISA è stato comparato con due diversi kits disponibili in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero. Le curve di regressione sono:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,96 \cdot (TSH \text{ CLIA}) + 0,06$$
$$r^2 = 0,972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,87 \cdot (TSH \text{ Elisa}) + 0,29$$
$$r^2 = 0,971$$

### 10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 500 mIU/L.

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

1. Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

**Ed. 01/2015**

**DCM013-11**

**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)



DCM013-11  
Ed. 01/2015

## TSH ELISA

for routine analysis

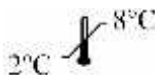
Direct immunoenzymatic determination of TSH in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO013

### INTENDED USE

Diametra TSH ELISA is an immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of thyroid-stimulating hormone (TSH, thyrotropin) concentration in human serum or plasma.

TSH ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Thyroid-stimulating hormone (TSH or thyrotropin) is a glycopolypeptide hormone synthesized and secreted by the anterior pituitary gland which regulates the endocrine function of the thyroid gland.

TSH consists of two subunits, the *alpha* and the *beta* subunit. The  $\alpha$  subunit is identical to that of human chorionic gonadotropin (HCG), luteinising hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH). The (*beta*) subunit is unique to TSH, and therefore determines its function.

TSH production is controlled by a Thyrotropin Releasing Hormone, (TRH), which is manufactured in the hypothalamus and transported to the pituitary gland, where it increases TSH production and release. Somatostatin is also produced by the hypothalamus, and has an opposite effect on the pituitary production of TSH, decreasing or inhibiting its release.

TSH stimulates the thyroid gland to secrete the hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3).

Release of TSH is regulated by the circulating free fraction of thyroid hormones in the blood. TSH levels are depressed when peripheral concentrations of the free fraction of thyroid hormones are high. Conversely, TSH levels are high when peripheral concentrations of thyroid hormones are low. This effect creates a regulatory negative feedback loop.

TSH levels are tested in the blood of patients suspected of suffering from excess (hyperthyroidism), or deficiency (hypothyroidism) of thyroid hormone. Generally, a normal range for TSH is between 0.3 and 3.0 mIU/mL, but the interpretation depends also on what the blood levels of thyroid hormones (T3 and T4) are.

Higher than normal levels of TSH combined with high levels of thyroid hormone (T3 and T4) may indicate dysfunction of the hypothalamus and pituitary gland. In these case, a high TSH is often produced by a benign

tumour of the pituitary (adenoma). Conversely, low levels of TSH, while blood levels of T3 and T4 are also low, indicates abnormally low function of the pituitary, known as hypopituitarism.

On the other hand, due to the negative feedback described above, abnormally high levels of Thyroid hormone, due to overproduction in the thyroid, results in low TSH levels. This occurs in diseases such as hyperthyroidism or Grave's disease. Conversely, an underproduction of T3 and T4 caused by diseases such as congenital hypothyroidism (cretinism), hypothyroidism or thyroid hormone resistance, gives rise to an increase in the measured TSH.

Clearly both TSH and T3 and T4 should be measured to ascertain where a specific thyroid disfunction is caused by primary pituitary or by a primary thyroid disease.

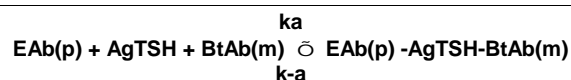
### 2. PRINCIPLE

The essential reagents required for an immunoenzymatic assay include high affinity and specificity antibodies (enzyme and immobilised) with different and distinct epitope recognition, in excess, and native antigen.

In this method, TSH calibrators, patient specimens and/or controls containing the native antigen are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labeled antibodies are added and the reactants mixed : these antibodies have high affinity and specificity and are detected against distinct and different epitopes of TSH.

Reaction between the various TSH antibodies and native TSH occurs in the microwells without competition or steric hindrance forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



**BtAb(m)** = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

**AgTSH** = Native Antigen (Variable Quantity)

**EAb(p)** = Enzyme labeled Antibody (Excess Quantity)

**EAb(p)-AgTSH-BtAb(m)** = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

**Ka** = Rate Constant of Association

**K-a** = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well though the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:

EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + Streptavidina CW. ⇨ Immobilized Complex

**Streptavidin CW.** = Streptavidin immobilized on well  
**Immobilized Complex** = Antibodies-Antigen sandwich bound.

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by decantation or aspiration. The enzyme activity in the antibody bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantified by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (7 vials, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/1306-0
CAL1	REF DCE002/1307-0
CAL2	REF DCE002/1308-0
CAL3	REF DCE002/1309-0
CAL4	REF DCE002/1310-0
CAL5	REF DCE002/1311-0
CAL6	REF DCE002/1312-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/1303-0

##### 3. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Goat antibody anti TSH conjugated with horseradish peroxidase HRP; mouse antibody anti TSH biotinylated

REF DCE002/1302-0

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Microplate coated with streptavidin

REF DCE002/1303-0

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 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 immediately after use. Once opened, the microplate 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<sup>R</sup> as preservative. 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/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 TSH from 0.2 mIU/L to 20.0 mIU/L.

### 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.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are

needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>6</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against WHO 2<sup>nd</sup> IRP 80/558 and have the following concentrations of TSH:

	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>
mIU/L	0	0.2	0.5	2.5	5.0	10	20

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 Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

### 6.3. Preparation of the Sample

TSH assay can be performed in human serum or plasma.

Specimens may be stored at 2-8°C for maximum two days. For longer storage, specimens should be frozen. Frozen specimens should be well mixed after thawing, and before assay. Avoid repeated freezing and thawing.

Serum samples with TSH concentrations greater than 20mIU/L should be diluted 1:2 with C<sub>0</sub>. Correct the result using an appropriate dilution factor.

The Control is ready to use.

### 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>	50 µL		
Sample/Control		50 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Cover the plate and incubate for 60 minutes at room temperature (22±28°C). To increase the sensibility read the absorbance after 120 min of incubation. Remove the content 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
Cover the plate and incubate for 20 minutes at room temperature (22±28°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the plate 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 TSH 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. 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es:Cubic Spline or 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 mIU/L.

## 9. REFERENCE VALUES

Serum samples of apparently healthy women and men were assayed using the TSH ELISA test, with the following results:

	Mean (mIU/L)	Range (mIU/L)
TSH	1.85	0.39 – 6.16

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 measurements (16x) of two different control sera in one assay. The within assay variability is 4.6%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate measurements (12x) of three different control sera in different lots of kit. The between assay variability is 10.8%.

### 10.2. Accuracy

The recovery of 0.25 – 2.5 – 10 mIU/L of TSH added to sample gave an average value (±SD) of 85.85% ± 2.62% with reference to the original concentrations.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of TSH that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.01 mIU/L with a confidence limit of 95%.

### 10.4. Specificity

The cross-reactivity of the thyrotropin ELISA method to selected substances was evaluated by adding the interfering substance to a serum matrix at various concentrations. The cross-reactivity was calculated

by the ratio between the dose of the interfering substance and the amount of TSH needed to obtain the same absorbance.

Thyrotropin (hTSH)	100 %
Thyrotropin - alpha (hTSH- )	9.3 %
Thyrotropin - beta (hTSH- )	152 %
Follicle-Stimulating Hormone (hFSH)	1.0 %
Luteinising hormone (hLH)	1.0 %
Chorionic Gonadotropin (hCG)	<0.1 %

### 10.5. Correlation with CLIA

Diametra TSH ELISA was compared with two others commercially available TSH assays. 54 serum samples were tested.

The two linear regression curves were calculated:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0.96 * (TSH \text{ CLIA}) + 0.06$$

$$r^2 = 0.972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0.87 * (TSH \text{ Elisa}) + 0.29$$

$$r^2 = 0.971$$

### 10.6. Hook Effect

Diametra TSH ELISA, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 500 mIU/L.

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

1. Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

Ed. 01/2015

DCM013-11

**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)



DCM013-11  
Ed. 01/2015

# TSH ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de TSH en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO013

## USO PREVISTO

El ensayo TSH ELISA se usa para la determinación cuantitativa de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, tirotropina) en suero o plasma humano.

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

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La hormona estimulante de la tiroides (TSH o tirotropina) es una hormona glicopéptida sintetizada y secretada por la hipófisis anterior y regula la función endocrina de la glándula tiroides.

La TSH está formada por dos subunidades: la subunidad  $\alpha$  es idéntica a la de la gonadotropina coriónica humana (HCG), la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH); la subunidad  $\beta$  es única para la TSH y, por lo tanto, determina su función.

La producción de TSH se controla por la hormona de liberación de tirotropina (TRH), que se produce en el hipotálamo y es transportada a la glándula pituitaria, en la que aumenta la producción y la liberación de TSH. Sin embargo, la somatostatina producida por el hipotálamo tiene un efecto opuesto en la producción pituitaria de TSH, puesto que disminuye o inhibe su liberación.

La TSH estimula la glándula tiroides induciendo la secreción de tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). La liberación de TSH está regulada por la fracción libre circulante de hormonas tiroideas en la sangre.

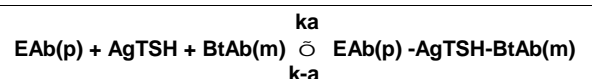
Los niveles de TSH disminuyen cuando las concentraciones periféricas de la fracción libre de hormonas tiroideas son altas. Por el contrario, se presentan niveles altos de TSH cuando las concentraciones periféricas de las hormonas tiroideas son bajas. Este efecto genera un ciclo de retroalimentación negativa.

Los niveles de TSH se midieron en pacientes con sospecha de hipertiroidismo o hipotiroidismo, exceso o carencia de la hormona tiroidea. Los niveles normales de TSH se encuentran entre 0,3 y 3,0 mIU/mL, pero la interpretación depende de los niveles de las hormonas tiroideas (T3 y T4).

Niveles elevados de TSH junto con niveles elevados de las hormonas tiroideas (T3 y T4) pueden indicar una disfunción del hipotálamo y de la glándula pituitaria. En este caso, los niveles altos de TSH se producen a menudo por un tumor benigno hipofisario (adenoma). Por el contrario, niveles bajos de TSH y niveles bajos de T3 y T4 circulantes indican hipopituitarismo. En caso de niveles anormalmente elevados de T3 y T4, debidos a la sobreproducción en la tiroides, el mecanismo de retroalimentación, descrito anteriormente, provoca bajos niveles de TSH. Así se presenta en enfermedades como el hipertiroidismo o la enfermedad de Graves. Por el contrario, una baja producción de T3 y T4 causada por enfermedades como el hipotiroidismo congénito (cretinismo), hipotiroidismo o resistencia de la hormona tiroidea, provoca un aumento de los niveles de TSH. Claramente, se deben medir ya sea la TSH o T3 y T4 para determinar qué disfunción tiroidea específica es causada por la hipófisis o por la tiroides.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Los requisitos esenciales para un ensayo inmunoenzimático son anticuerpos de alta afinidad y especificidad (conjugados con enzima e inmovilizados), con epítomos distintos. En este procedimiento, el anticuerpo se une a la superficie del pocillo mediante la interacción de la estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-TSH monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítomos distintos. En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble. La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



**BtAb(m)** = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

**AgTSH** = antígeno nativo (cantidad variable)

**EAb(p)** = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

**EAb(p)-AgTSH-BtAb(m)** = complejo sándwich antígeno-anticuerpo

**ka** = constante de asociación

**k-a** = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:

**EAb(p)-AgTSH-BtAb(m) + estreptavidina CW. ⇒ Compl. inmovilizado**

**Estreptavidina C.W.** = estreptavidina inmovilizada en el pocillo

**Compl. inmovilizado** = enlace sándwich anticuerpo-antígeno

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante un lavado. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante la reacción con un sustrato que produce una coloración.

Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

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

CAL0 **REF DCE002/1306-0**

CAL1 **REF DCE002/1307-0**

CAL2 **REF DCE002/1308-0**

CAL3 **REF DCE002/1309-0**

CAL4 **REF DCE002/1310-0**

CAL5 **REF DCE002/1311-0**

CAL6 **REF DCE002/1312-0**

2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

**REF DCE045/1303-0**

3. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo cabra anti TSH conjugado con peroxidasa de rabano (HRP); anticuerpo ratón anti TSH biotinilado

**REF DCE002/1302-0**

4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Una microplaca recubierta con estreptavidina

**REF DCE002/1303-0**

5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

**REF DCE004-0**

6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

**REF DCE005-0**

7. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L, Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

#### 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.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/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 TSH de 0,2 a 20,0 mIU/L

### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya 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 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 parada. Tanto el sustrato como la solución de parada 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, son calibrados frente a WHO 2<sup>a</sup> IRP 80/558, y tienen las siguientes concentraciones de TSH:

	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>
mIU/L	0	0,2	0,5	2,5	5,0	10	20

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

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación de la muestra

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

Si la prueba no se realiza en un plazo de dos días desde la extracción, conservar la muestra a -20 °C.

Para almacenamientos largos, congelar las muestras. Las muestras congeladas deben agitarse bien tras descongelarse y antes de la dosificación. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Para muestras con una concentración superior a 20 mIU/L, diluir 1:2 la muestra con Calibrador 0. Corregir el resultado usando el factor de dilución correspondiente.

El Control está listo para usar.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>6</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra /Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>6</sub>	50 µL		
Muestra /Control		50 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	

Cubrir la placa y incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente (22±28°C). Para aumentar la sensibilidad, prolongar el tiempo de incubación a 120 minutos.

Retirar la mezcla de reacción y lavar los pocillos seis veces con 300 µL 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.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Cubrir la placa y incubar 20 minutos a temperatura ambiente (22±28°C). Protegida de la luz.

Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Agitar con cuidado para mezclar las soluciones. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de TSH 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.

Además, la capacidad de absorción máxima debe ser constante con la experiencia anterior. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden 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 absorbancia media ( $E_m$ ) de cada punto de la curva de calibración ( $C_0$ - $C_6$ ) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias ( $E_m$ ) de cada Calibrador ( $C_0$ - $C_6$ ) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos Calibrador (p. ej.: modelo spline cúbico o modelo logístico de 4 parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

Interpolar a la curva las concentraciones de TSH correspondientes al control y a las muestras.

## 9. VALORES DE REFERENCIA

Las muestras de suero en mujeres y hombres sanos se han analizado utilizando el TSH IEMA TEST con los siguientes resultados:

	Media (mIU/L)	Rango (mIU/L)
<b>TSH</b>	1,85	0,39 – 6,16

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 (16x) la medición de dos sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 4,6%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (12x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 10,8%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 0,25 – 2,5 – 10 mIU/L de TSH ha dado un valor medio ( $\pm$ SD) de 88,85%  $\pm$  2,62%.

### 10.3. Sensibilidad

Tomando como base los resultados de la determinación del valor del Calibrador 0 de 16 réplicas, la concentración mínima medible con este método es de 0,01 mIU/L con un límite de confianza del 95%.

### 10.4. Especificidad

La reactividad cruzada de la tirotropina ELISA a las sustancias seleccionadas se estimó mediante la adición de sustancias interferentes al suero en concentraciones distintas. La reactividad cruzada se calculó evaluando la relación entre la dosis de la sustancia interferente y la cantidad de TSH necesaria para producir la misma absorbancia.

Tirotropina (hTSH)	100 %
Tirotropina - alfa (hTSH- )	9,3 %
Tirotropina - beta (hTSH- )	152 %
Folitropina (hFSH)	1,0 %
Hormona luteinizante (hLH)	1,0 %
Gonadotropina coriónica (hCG)	<0,1 %

### 10.5. Correlación con otros métodos

El kit TSH ELISA (Diametra) se ha comparado con dos kits distintos disponibles en el mercado. Se han comprobado 54 muestras de suero.

Las curvas de regresión son:

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,96*(TSH \text{ CLIA})+0,06$$

$$r^2 = 0,972$$

$$(TSH \text{ Diametra}) = 0,87*(TSH \text{ Elisa}) + 0,29$$

$$r^2 = 0,971$$

### 10.6. Efecto gancho

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 500 mIU/L.

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Hopton M. R, et al *Clinical Chemistry*, 32, 691 (1986)
2. Caldwell, G. et al. *Lancet*, I, 1117, (1985)
3. Young, D. S, et al *Clinical Chemistry* 21, 3660 (1975)
4. Spencer, CA, et al *Clinical Chemistry* 41, 367 (1995)
5. Beck-Peccoz P, et al *Eur. J. Endocrinol* 131: 331-340 (1994)
6. Bravemann, L. E, *Clinical Chemistry* 42: 174-181 (1996)
7. Fisher, D. A., *Clinical Chemistry* 42: 135-139 (1996)

**Ed. 01/2015**

**DCM013-11**

**DiaMetra S.r.l. Headquater:** Via Calabria 15,  
20090 SEGRATE (MI) Italy  
Tel. +39-02-2139184  
Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](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



DCM039-10  
Ed. 01/2016

# FERRITIN ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta della Ferritina nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO039

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di Ferritina nel siero o plasma umano.

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

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

La Ferritina è una proteina globulare presente principalmente nel fegato, che può immagazzinare circa 2250 ioni di ferro (Fe<sup>3+</sup>). La molecola di ferritina (apoferritin) è composta da unità secondarie pesanti e leggere, che circondano un nucleo cristallino che contiene l'ossido ed il fosfato di ferro. La Ferritina è sintetizzata nel fegato, nella milza e in numerosi altri tessuti, le concentrazioni maggiori sono presenti nel fegato, nella milza, nel midollo osseo e nel mucosa intestinale.

I livelli di ferritina hanno una correlazione diretta con la quantità totale di ferro immagazzinata nel corpo. Se il livello di ferritina è alto, il ferro in eccesso è espulso. Se il livello di ferritina è basso, vi è un rischio di carenza di ferro che potrebbe condurre all'anemia.

Nella regolazione dell'anemia, la misurazione della ferritina sierica è la prova di laboratorio più sensibile per valutare l'anemia da mancanza del ferro. In opposizione, livelli di ferritina sierica normali o aumentati sono connessi all'anemia cronica.

Livelli elevati di ferritina nel siero sono stati osservati nelle affezioni epatiche acute e croniche e nella leucemia e linfoma di Hodgkin. Livelli elevati di ferritina nel siero sono stati associati anche con un rischio elevato di infarto miocardico negli uomini.

Ferritin inoltre è usato come indicatore per i disordini dovuti al sovraccarico di ferro, quali l'emocromatosi il livello di ferritina può essere elevato.

La Ferritina è un reattivo di fase-acuta, è spesso elevata nel corso della malattia.

Il ferro libero è tossico alle cellule ed il corpo ha un insieme elaborato dei meccanismi protettivi per legare il ferro in vari scompartimenti dei tessuti. All'interno delle cellule, il ferro è immagazzinato complessato a proteine come la ferritina o l'emosiderina. L'apoferritina lega il ferro ferroso libero e lo immagazzina come ferrico.

In condizioni normali il livello di ferritina nel siero è in equilibrio con i depositi di ferro; quindi, il livello di

ferritina sierica è la prova di laboratorio più efficace per valutare i depositi del ferro.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit Diametra Ferritin ELISA è basato sulla cattura simultanea della Ferritina umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastra, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di 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 proporzionale alla concentrazione di Ferritina presente nel campione.

La concentrazione della Ferritina nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

#### 1. Calibrators (6 flaconi)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/3906-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/3907-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/3908-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/3909-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/3910-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/3911-0

#### 2. Control (1 vial, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/3903-0

#### 3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti Ferritina coniugato a Perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/3902-0

#### 4. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Ferritina assorbito sulla micropiastra

REF DCE002/3903-0

#### 5. 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

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 e strumentazione ausiliare

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.*

*Evitare di staccare l'etichetta 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.
- 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 Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 Ferritina da 5 ng/mL a 1000 ng/mL.

### 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono calibrati contro il WHO 1<sup>st</sup> IS Ferritin Human Liver 80/602 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

Per campioni con concentrazione superiore a 1000 ng/mL diluire il campione con C<sub>0</sub>.



Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

### 6.2. 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.

### 6.3. Preparazione del campione

La determinazione della Ferritina si effettua su siero o plasma umano. Il campione può essere conservato a 2-8°C per un breve periodo (massimo 5 giorni). Per periodi più lunghi, conservare il campione a -20°C. Evitare cicli di congelamento e scongelamento.

Il Controllo è pronto all'uso.

### 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 essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Campione /Controllo		20 µL	
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	

Incubare 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Allontanare la miscela di reazione. Lavare i pozzetti 3 volte con 0.3 mL 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 10 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 Ferritina 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>5</sub>) e di ogni campione.

### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascuno Calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti Calibratori (es: Cubic Spline o 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

I valori serici di Ferritina sono compresi nei seguenti intervalli:

		Media (ng/mL)	Range (ng/mL)
Donne	età fertile	53	6 - 180
	post-menopausa	105	8 – 350
Uomini		175	20 – 400

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 (15x) il dosaggio di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 7,5%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (16x) il dosaggio di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 6,1%.

### 10.2. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate, calcolate in base al rapporto in massa:

Liver Human Iso-Ferritin	100%
Splean Human Iso-Ferritin	80%
Hearth Human Iso-Ferritin	12%

### 10.3. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campione arricchito con 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 ng/mL di Ferritina, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 98,66%  $\pm$  2,90%.

La prova di diluizione effettuata su 3 campioni diluiti fino a 8 volte ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 102,11%  $\pm$  5,32%.

### 10.4. Sensibilità

La concentrazione minima di Ferritina misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,04 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.5. Correlazione con il dosaggio RIA

Il kit Ferritin ELISA Diametra è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati i campioni di siero di 22 donne e 32 uomini.

La curva di regressione è:

$$(\text{Ferritin Diametra}) = 1,11 * (\text{Ferritin Diasorin}) - 10,46$$
$$r^2 = 0,972$$

### 10.6. Effetto "Hook"

In questo metodo non è stato osservato effetto Hook fino a 50000 ng/mL.

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

## BIBLIOGRAFIA

- Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
- Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1 80 – 82 (1979)
- Van Oost, S.A. et al Clin. Chem 28/12, 2429 – 2433 (1982)
- Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

Ed. 01/2016

DCM039-10

**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)



DCM039-10  
Ed. 01/2016

# FERRITIN ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Ferritin in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO039

## INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Ferritin concentration in human serum or plasma.

Ferritin ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Ferritin is a globular protein found mainly in the liver, which can store about 2'250 iron ( $Fe^{3+}$ ) ions. The ferritin molecule consists of a protein shell (apoferritin) composed of heavy and light subunits, which surrounds a crystalline core containing iron oxide and phosphate.

Ferritin is synthesized in the liver, spleen and numerous other body tissues, with major concentrations found in the liver, spleen, bone marrow, and intestinal mucosa

The ferritin levels measured have a direct correlation with the total amount of iron stored in the body. If ferritin is high there is iron in excess, which would be excreted in the stool. If ferritin is low there is a risk for lack in iron, which sooner or later could lead to anaemia.

In the setting of anaemia, serum ferritin is the most sensitive lab test for iron deficiency anaemia. In contrast, serum ferritin levels are normal or increased in anemia associated with chronic disease. Elevated serum ferritin levels have been observed in acute and chronic liver disease and lymphoid malignancy (leukemia and Hodgkin lymphoma). High serum ferritin levels have also been associated with an elevated risk for myocardial infarction in men. Ferritin is also used as a marker for iron overload disorders, such as haemochromatosis in which the ferritin level may be abnormally raised.

Ferritin is an acute-phase reactant, it is often elevated in the course of disease.

Free iron is toxic to cells, and the body has an elaborate set of protective mechanisms to bind iron in various tissue compartments. Within cells, iron is stored complexed to protein as ferritin or hemosiderin. Apoferritin binds to free ferrous iron and stores it in the ferric state. Under steady state conditions, the serum ferritin level correlates with total body iron stores; thus, the serum ferritin level is the most convenient laboratory test to estimate iron stores.

## 2. PRINCIPLE

Diametra Ferritin ELISA test is based on simultaneous binding of human Ferritin to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates and the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

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 proportional to the Ferritin concentration in the sample.

The Ferritin concentration in the sample is calculated based on a standard curve.

## 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

#### 1. Calibrators (6 vials)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/3906-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/3907-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/3908-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/3909-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/3910-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/3911-0

#### 2. Control (1 vial, 1 mL)

Control concentration is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/3903-0

#### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Anti Ferritin antibody conjugated with Horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/3902-0

#### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Ferritin antibody adsorbed on microplate

REF DCE002/3903-0

#### 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 2-8°C in the dark.*

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

*Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised.*

## 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, Calibrators and Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. 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/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 Ferritin from 5 to 1000 ng/mL.

## 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated against the WHO 1<sup>st</sup> IS Ferritin 80/602 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

For sample with concentration over 1000 ng/mL dilute the sample with C<sub>0</sub>.

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

### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content 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 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.

### 6.3. Preparation of the Sample

Ferritin determination should be done in human serum or plasma. Specimen can be stored at 2-8°C for at short time (max five days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C. Avoid repeated freezing and thawing. The Control is ready to use.

### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/Control	Blank
Sample/Control		20 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate for 1 hour at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well. Wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate for 10 minutes at room temperature (22-28°C) 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 Ferritin 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 absorbencies (E<sub>m</sub>) corresponding to the single points to the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</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>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Cubic Spline or 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 values are comprised in the following intervals:

		Mean (ng/mL)	Range (ng/mL)
<b>Women</b>	Premenopausal	53	6 – 180
	Post-menopausal	105	8 – 350
<b>Men</b>		175	20 – 400

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

**10.1. Precision***10.1.1. Intra Assay*

Within run variation was determined by replicate (15x) the measurements of three different control sera in one assay. The within assay variability is 7.5%.

*10.1.2. Inter Assay*

Between run variations was determined by replicate (16x) the measurements of three different control sera in different lots. The between assay variability is 6.1%.

**10.2. Specificity**

The cross reaction of the antibody calculated on a weight/weight basis are shown in the table:

Liver Human Iso-Ferritin	100%
Spleen Human Iso-Ferritin	80%
Hearth Human Iso-Ferritin	12%

**10.3. Accuracy**

The recovery of 12.5 – 25 – 50 – 100 – 200 ng/mL of Ferritin added to sample gave an average value ( $\pm$ SD) of 98.66%  $\pm$  2.90%.

The dilution test performed on 3 samples diluted up to 8 times gave an average value ( $\pm$ SD) of 102.11%  $\pm$  5.32%.

**10.4. Sensitivity**

The lowest detectable concentration of Ferritin that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.04 ng/mL at the 95% confidence limit.

**10.5. Correlation with RIA**

Diametra Ferritin ELISA kit was compared to another commercially available Ferritin assay. Serum samples of 22 females and 32 males were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated  
 (Ferritin Diametra)= 1.11\*(Ferritin Diasorin) - 10.46  
 $r^2 = 0.972$

**10.6. Hook Effect**

Ferritin ELISA kit, a competitive enzyme immunoassay, shows no Hook Effect up to 50000 ng/mL

**11. WASTE MANAGEMENT**

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

**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)

**BIBLIOGRAPHY**

- Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
- Watanabe, N. et al Clin. Chem.,25/1 , 80 – 82 (1979)
- Van Oost, S.A. et al Clin. Chem ,28/12 ,2429 – 2433 (1982)
- Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)



DCM039-10  
Ed. 01/2016

# FERRITIN ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de Ferritina en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO039

## USO PREVISTO

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

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

## 1. IMPORTANCIA CLÍNICA

La ferritina es una proteína globular que se encuentra principalmente en el hígado, que puede almacenar alrededor de 2250 iones de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ). La molécula de ferritina (apoferritina) se compone de subunidades pesadas y ligeras alrededor de un núcleo cristalino que contiene óxido de hierro y fosfato. La ferritina es sintetizada en el hígado, el bazo y en muchos otros tejidos, las mayores concentraciones están presentes en el hígado, bazo, médula ósea y la mucosa intestinal.

Los niveles de ferritina tienen una correlación directa con la cantidad total de hierro almacenado en el cuerpo. Si el nivel de ferritina es alto hay un exceso de hierro que se excretará. Si el nivel de ferritina es bajo, se corre el riesgo de deficiencia de hierro que podría conducir a la anemia.

En el contexto de la anemia, la medición de la ferritina sérica es la prueba de laboratorio más sensible en la evaluación de la anemia por deficiencia de hierro. En contraste, los niveles de ferritina sérica pueden ser elevados o normales en las anemias asociadas a enfermedades crónicas.

Niveles elevados de ferritina sérica se han observado en la enfermedad hepática aguda o crónica, en la leucemia y en el linfoma de Hodgkin. Los niveles elevados de ferritina sérica se asocian con un mayor riesgo de infarto de miocardio en los hombres.

La ferritina también se utiliza como un indicador de los trastornos debidos a la sobrecarga de hierro como en la hemocromatosis, en la cual los niveles de ferritina pueden estar elevados.

La ferritina es un reactante de fase aguda, con frecuencia se eleva el curso de las enfermedades.

El hierro libre es tóxico para las células y el cuerpo tiene un elaborado conjunto de mecanismos de protección para unir el hierro en diferentes compartimentos de los tejidos. Dentro de las células, el hierro se almacena en forma de complejo con algunas proteínas como la ferritina o la hemosiderina.

El apoferritina se une al hierro ferroso libre y lo almacena en su estado ferrico.

En condiciones normales, el nivel de ferritina sérica está en equilibrio con los depósitos de hierro, por lo que el nivel de ferritina sérica es la prueba de laboratorio más eficaz para evaluar las reservas de hierro.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

La prueba Diametra Ferritin se basa en la captura simultánea de la Ferritin por dos anticuerpos monoclonales humanos, uno inmovilizado en la placa de microtitulación y el otro conjugado con peroxidasa de rábano otros (HRP).

Después de un cierto período de 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 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 parada ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de Ferritina en la muestra.

La concentración de Ferritina en la muestra se calcula a partir de una curva de calibración.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTOS

### 3.1 Reactivos y materiales incluidos en el kit

#### 1. Calibradores (6 frascos)

CAL0 (3 mL)

REF DCE002/3906-0

CAL1 (1 mL)

REF DCE002/3907-0

CAL2 (1 mL)

REF DCE002/3908-0

CAL3 (1 mL)

REF DCE002/3909-0

CAL4 (1 mL)

REF DCE002/3910-0

CAL5 (1 mL)

REF DCE002/3911-0

#### 2. Control

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

REF DCE045/3903-0

#### 3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo anti Ferritina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP)

REF DCE002/3902-0

#### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca divisible)

Anticuerpo anti Ferritina absorbido en la microplaca

REF DCE002/3903-0

5. Substrato 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 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. No separe la hoja adhesiva de las tiras que no vaya a utilizar de inmediato.

### 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 Calibradores y los Controles deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

- Con este método pueden determinarse cuantitativamente valores de Ferritina desde 5 hasta 1000 ng/mL.

### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada 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>5</sub>)

Los Calibradores son listo para usar, son calibrados frente al estándar internacional WHO 1<sup>st</sup> IS Ferritin Human Liver 80/602, y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	20	100	400	1000

Para muestras con una concentración superior a 1000 ng/mL, diluir la muestra con Calibrador 0.

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

### 6.2. 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

### 6.3. Preparación de la muestra

La determinación de Ferritina se puede realizar en el plasma o suero humano. Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2-8°C durante un máximo de 5 días. Si no es posible analizarlas en dicho periodo de tiempo, se pueden conservar a una temperatura de -20°C.

Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos.

El Control es listo para usar.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/Control	Blanco
Muestra/Control		20 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	20 µL		
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar la mezcla de reacción. Lave los pozos 3 veces con 0,3 mL de solución de lavado diluida. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
TMB Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 10 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 controles para los rangos bajo, medio y alto de ferritina 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 (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>). 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 Ferritina en suero o plasma están incluidas en los siguientes intervalos:

		Media (ng/mL)	Rango (ng/mL)
Mujeres	Fértil	53	6 - 180
	Post menopausicas	105	8 - 350
Varones		175	20 - 400

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 (15x) tres niveles diferentes de sueros de control. La variabilidad dentro del ensayo es 7,5%.

#### 10.1.2 Entre ensayos

La variabilidad entre kits diferentes se determinó repitiendo (16x) tres niveles diferentes de suero de control con kit de lotes diferentes. La variabilidad entre ensayos es 6,1%.

### 10.4 Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas:

Liver Human Iso-Ferritin	100%
Splean Human Iso-Ferritin	80%
Heart Human Iso-Ferritin	12%

### 10.2 Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 12.5 - 25 - 50 - 100 - 200 ng/mL de Ferritina ha dado un valor medio ( $\pm$ SE) de 98,66%  $\pm$  2,90%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 8 veces dió una media ( $\pm$ SD) de 102,11%  $\pm$  5,32%.

### 10.3 Sensibilidad

La concentración mínima de Ferritina detectable que puede distinguirse del Calibrador 0 es de 0,04 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.5 Correlación

El Ferritina Diametra kit fue comparado con otro ensayo comercial de Ferritina. Se analizaron 22 muestras de suero de mujeres y 32 de hombres.

Se calculó la curva de regresión lineal:

(Diametra) = 1,11\*(Diasorin) - 10,46

r<sup>2</sup> = 0,972

## 11. INDICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN

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

## BIBLIOGRAFÍA

- Walter G.O., et al J. Clin. Path . 29 770 - 772 (1973)
- Watanabe, N. et al Clin. Chem., 25/1 80 – 82 (1979)
- Van Oost, S.A. et al Clin. Chem 28/12, 2429 – 2433 (1982)
- Ronald H, et al Clin. Chem 29/6, 1109 - 1113 (1983)

Ed. 01/2016

DCM039-10

**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)

	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



DCM051-9  
Ed. 01/2015

## CEA ELISA

per analisi di routine

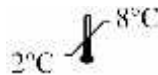
Determinazione quantitativa dell'antigene Carcinoembrionico (CEA) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO051

### DESTINAZIONE D'USO

Il kit CEA ELISA è un metodo immunoenzimatico diretto in fase solida per la determinazione quantitativa dell'antigene Carcinoembrionico (CEA) nel siero o plasma umano.

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

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

L'antigene Carcinoembrionico (CEA) è una glicoproteina, di 180 kD, coinvolta nell'adesione cellulare. È prodotto normalmente durante lo sviluppo fetale, ma la produzione cessa prima della nascita. Di conseguenza, non è solitamente presente nel sangue degli adulti in buona salute, anche se i livelli sono aumentati nei pesanti fumatori.

CEA è stato identificato in campioni di tessuti di cancro al colon umano. Successivamente è stato trovato nel siero di pazienti con carcinoma colon-rettale ed anche pazienti con altri tipi di cancro presentano livelli elevati di CEA, quindi come marker tumorale può essere impiegato per controllare la risposta al trattamento del cancro al colon.

CEA ed i geni relativi costituiscono la famiglia di CEA che appartiene al superfamiglia delle immunoglobuline. Il cancro che più frequentemente causa un aumento del CEA è il cancro del colon e del retto. Altre forme di cancro incluso il cancro del pancreas, dello stomaco, del seno, del polmone e determinati tipi di cancro alla tiroide e di cancri ovarici presentano elevati livelli di CEA. Le situazioni benigne in cui il CEA presenta livelli elevati, includono il fumo, infezioni, infiammazione delle viscere, pancreatiti, la cirrosi epatica ed alcuni tumori benigni negli stessi organi in cui un CEA elevato indica il cancro. La radioterapia e la chemioterapia possono causare un aumento provvisorio dei livelli di CEA, dovuto alla morte delle cellule tumorali ed al rilascio di CEA nella circolazione sanguigna. I tumori benigni non causano solitamente un aumento superiore a 10 ng/mL.

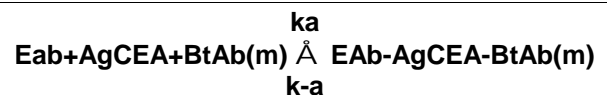
### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Nel presente metodo i calibratori, i campioni dei pazienti e/o i controlli (contenenti l'antigene CEA nativo) sono aggiunti ai pozzetti della micropiastra sensibilizzati con la streptavidina. Successivamente, vengono aggiunti, in eccesso, sia anticorpi anti-CEA monoclonali biotinilati, sia anticorpi coniugati all'enzima, e i reagenti vengono mescolati: entrambi i

tipi di anticorpi sono ad alta affinità e specificità e riconoscono epitopi diversi di CEA.

Nei pozzetti della micropiastra, la reazione tra l'antigene nativo e gli anticorpi avviene senza competizione o impedimento sterico, e dà luogo ad un complesso *sandwich* solubile.

L'interazione è illustrata dalla seguente equazione:



**BtAb(m)** = Anticorpo Biotinilato Monoclonale (in eccesso)

**AgCEA** = Antigene Nativo (Quantità Variabile)

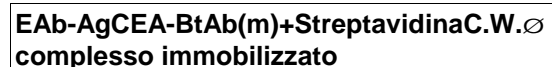
**EAb** = Anticorpo Marcato con Enzima (in eccesso)

**EAb-AgCEA-BtAb(m)** = Complesso Sandwich Antigene-Anticorpi

**ka** = Costante di Associazione

**k-a** = Costante di Dissociazione

Contemporaneamente, il complesso viene fissato sul pozzetto mediante la reazione ad alta affinità tra la streptavidina e l'anticorpo biotinilato. Tale interazione è illustrata qui sotto:



**Streptavidina C.W.** = Streptavidina immobilizzata sul pozzetto

**Complesso immobilizzato** = Legame sandwich Anticorpo-Antigene legato alla superficie

Una volta raggiunto l'equilibrio, la frazione legata all'anticorpo si separa dall'antigene non reagito mediante decantazione o aspirazione. L'attività enzimatica nella frazione legata all'anticorpo è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'antigene nativo libero.

L'attività dell'enzima è quantificata mediante la reazione con un substrato che produce una colorazione.

Utilizzando diversi calibratori a concentrazione nota di antigene, è possibile tracciare una curva dose-risposta, da cui si può determinare la concentrazione incognita dell'antigene.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

##### 1. Calibrators (6 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF	DCE002/5106-0
CAL1	REF	DCE002/5107-0
CAL2	REF	DCE002/5108-0
CAL3	REF	DCE002/5109-0
CAL4	REF	DCE002/5110-0
CAL5	REF	DCE002/5111-0

##### 2. Conjugate (1 fialone, 13 mL)

Anticorpi Anti CEA coniugato a Perossidasi di rafano (HRP) e Anti CEA Biotinilato

REF DCE002/5102-0

##### 3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Micropiastra coattata con streptavidina

REF DCE002/5103-0

##### 4. TMB Substrate (1 fialone, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

##### 5. Stop Solution (1 fialone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

##### 6. 50X Conc. Wash Solution (1 fialone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

#### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

Lettore per micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

#### Note

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

Aprire la busta del Reattivo 3 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strisce 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 Calibratori devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 CEA da 5 ng/mL a 250 ng/mL.
- Il CEA, in quanto marcatore tumorale, possiede una sensibilità e una specificità basse. Dal punto di vista clinico, valori di CEA elevati, da soli, non hanno il valore diagnostico di test per l'accertamento del cancro e quindi dovrebbero essere utilizzati sempre insieme ad altre osservazioni cliniche e parametri diagnostici. Può accadere che pazienti con cancro colon-rettale non presentino valori elevati di CEA, e valori elevati di CEA non sempre variano con la progressione o la regressione del cancro. I fumatori presentano una più ampia gamma di valori di base rispetto ai non fumatori.

#### 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono pronti all'uso, sono stati tarati usando una preparazione di riferimento che è stata calibrata contro 1<sup>st</sup> IRP 73/601 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	250

Una volta aperti i Calibratori sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

### 6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "50X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

### 6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni sierici o plasmatici umani, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; quindi lasciare coagulare il sangue e centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere conservati a 2÷8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile analizzare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperatura di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

Se testati in duplicato, sono necessarie quantità di 0,050 mL dei campioni.

Per campioni con concentrazione superiore a 250 ng/mL diluire il campione con C<sub>0</sub>.

## 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione	Bianco
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Campione		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di soluzione di lavaggio 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> 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 CEA per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Si dovrebbero compilare le tabelle di controllo qualità per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Per accertare il trend dovrebbero essere impiegati metodi statistici adeguati. 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. Inoltre, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato nelle condizioni sperimentali o degradazione dei reagenti del kit. Per determinare il motivo delle variazioni si dovrebbero usare reagenti freschi.

## 8. RISULTATI

### 8.1. Note

Le densità ottiche (O.D.) di alcuni calibratori e di alcuni campioni potrebbero essere superiori a 2,0, e in tal caso, potrebbero essere fuori dal range di misurazione di alcuni lettori di micropiastre. È necessario in questi casi eseguire anche una lettura a 405 nm oltre alla lettura a 450 nm e a 620 nm.

Se si utilizzano lettori non in grado di leggere a 3 lunghezze d'onda contemporaneamente, si raccomanda di procedere come segue:

- leggere la micropiastra a 450 nm e a 620 nm.
- leggere di nuovo la micropiastra a 405 nm e 620 nm.
- selezionare i pozzetti le cui OD a 450 nm sono più alte di 2,0.
- selezionare le corrispondenti OD a 405 nm e moltiplicare questi valori a 405 nm per fattore di conversione 3,0 (dove  $OD_{450}/OD_{405} = 3,0$ ), cioè:  $OD_{450\text{ nm}} = OD_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Nota bene: il fattore 3,0 è solamente suggerito. Per migliore accuratezza, gli utilizzatori devono calcolare il fattore di conversione sul proprio lettore.

La OD del calibratore 5 deve essere  $\geq 1,3$ .

### 8.2. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media ( $E_m$ ) di ciascun punto della curva di calibrazione ( $C_0$ - $C_5$ ) e di ogni campione.

### 8.3. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie ( $E_m$ ) di ciascun Calibratore ( $C_0$ - $C_5$ ) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

### 8.4. 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

Circa il 99% dei non fumatori hanno concentrazioni di CEA minori di 5 ng/mL; similmente circa il 99% dei fumatori hanno concentrazioni di CEA minori di 10 ng/mL (4).

	ng/mL
Non fumatori	<5
Fumatori	<10

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 dosaggio è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri di controllo in un unico dosaggio. La variabilità intra-assay è 5,8%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra dosaggi differenti è stata determinata replicando (20x) la misura di tre differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 9,9%.

### 10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su campioni arricchiti con 10 - 20 - 40 ng/mL di CEA, ha dato un valore medio ( $\pm$ SD) di 100,7%  $\pm$  7,2%.

### 10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CEA misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,11 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.4. Specificità

Al fine di determinare la specificità della coppia di anticorpi usati per il CEA Elisa kit, sono state aggiunte massicce dosi dei relativi antigeni ad un pool di sieri di pazienti:

Analita	Concentrazione	Cross Reaction
CEA		100 %
-HCG	250 ng/mL	ND
AFP	5000 ng/mL	ND
CA-125	1000 U/mL	ND
PSA	1000 ng/mL	ND
CA 19-9	1000 U/mL	ND

### 10.5. Correlazione

Il kit Diametra CEA ELISA è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 167 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 1,019x - 0,200$$

$$r^2 = 0,992$$

$$y = \text{CEA kit commerciale}$$

$$x = \text{CEA kit Diametra}$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Gold P, Freedman SO, J Exp Med , 121, 439 (1965)
- 2) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 3) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p444
- 5) Sorokin JJ, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

**Ed. 01/2015**

**DCM051-9**

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



DCM051-9  
Ed. 01/2015

## CEA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO051

### INTENDED USE

Diametra CEA ELISA kit is a direct solid phase enzyme immunoassay for quantitative determination of Carcinoembryonic Antigen (CEA) in human serum or plasma.

CEA ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein, with a molecular weight of 180 kD, involved in cell adhesion. It is normally produced during fetal development, but the production of CEA stops before birth. Therefore, it is not usually present in the blood of healthy adults, although levels are raised in heavy smokers. CEA was identified in human colon cancer tissue extracts. It was later found that serum from individuals with colorectal and other carcinomas had higher levels of CEA than healthy individuals and can be used to monitor the response to colon cancer treatment.

CEA and related genes make up the CEA family belonging to the immunoglobulin superfamily.

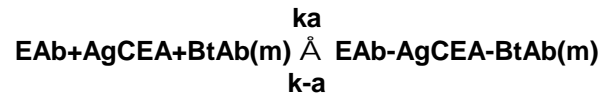
The most frequent cancer which causes an increased CEA is cancer of the colon and rectum. Others include cancers of the pancreas, stomach, breast, lung, and certain types of thyroid and ovarian cancer. Benign conditions which can elevate CEA include smoking, infections, inflammatory bowel disease, pancreatitis, cirrhosis of the liver, and some benign tumors in the same organs in which an elevated CEA indicates cancer. Chemotherapy and radiation therapy can cause a temporary rise in CEA due to the death of tumor cells and release of CEA into the blood stream. Benign tumours does not usually cause an increase above 10 ng/mL.

### 2. PRINCIPLE

In this method, the calibrators, the patient specimens and/or the controls (containing the native CEA antigen) are first added to streptavidin coated wells. Biotinylated monoclonal and enzyme labelled antibodies are then added and the reactants mixed: these antibodies have high affinity and specificity and are directed against distinct and different epitopes of CEA.

Reaction between the various CEA antibodies and native CEA occurs in the microwells without competition or steric hindrance, forming a soluble sandwich complex.

The interaction is illustrated by the following equation:



**BtAb(m)** = Biotinylated Monoclonal Antibody (Excess Quantity)

**AgCEA** = Native Antigen (Variable Quantity)

**EAb** = Enzyme labelled Antibody (Excess Quantity)

**EAb-AgCEA-BtAb(m)** = Antigen-Antibodies Sandwich Complex

**k<sub>a</sub>** = Rate Constant of Association

**k<sub>-a</sub>** = Rate Constant of Dissociation

Simultaneously, the complex is deposited to the well through the high affinity reaction of streptavidin and biotinylated antibody. This interaction is illustrated below:



**StreptavidinC.W.** = Streptavidin immobilized on well  
**Immobilized complex** = sandwich complex bound to the well

After equilibrium is attained, the antibody-bound fraction is separated from unbound antigen by a washing step.

The enzyme activity in the antibody-bound fraction is directly proportional to the native antigen concentration. The activity of the enzyme present on the surface of the well is quantified by reaction with a suitable substrate to produce colour. By utilizing several different calibrators of known antigen values, a dose response curve can be generated from which the antigen concentration of an unknown can be ascertained.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials, 1 mL each)

CAL0	<b>REF</b>	<b>DCE002/5106-0</b>
CAL1	<b>REF</b>	<b>DCE002/5107-0</b>
CAL2	<b>REF</b>	<b>DCE002/5108-0</b>
CAL3	<b>REF</b>	<b>DCE002/5109-0</b>
CAL4	<b>REF</b>	<b>DCE002/5110-0</b>
CAL5	<b>REF</b>	<b>DCE002/5111-0</b>

##### 2. Conjugate (1 vial, 13 mL)

Antibodies anti CEA conjugated with Horseradish peroxidase (HRP) and anti CEA biotinylated

**REF** **DCE002/5102-0**

##### 3. Coated Microplate (1 microplate breakable)

Microplate coated with streptavidin

**REF** **DCE002/5103-0**

##### 4. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

**REF** **DCE004-0**

##### 5. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

**REF** **DCE005-0**

##### 6. 50X Conc. Wash Solution (1 vial, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF** **DCE006-0**

#### 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 at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 3 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close 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 Calibrators should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> as preservative. 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/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 CEA from 5.0 to 250 ng/mL.
- CEA has a low clinical sensitivity and specificity as a tumour marker. Clinically an elevated CEA value alone is not of diagnostic value as a test for cancer and should only be used in conjunction with other clinical manifestations (observations) and diagnostic parameters. There are patients with colorectal cancer that do not exhibit elevated CEA values and elevated CEA values do not always change with progression or regression of disease. Smokers demonstrate a higher range of baseline values than non-smokers.

### 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, it 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

## 6. PROCEDURE

### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are ready to use, are calibrated using a reference preparation which was assayed against the 1<sup>st</sup> IRP 73/601 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	250

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

### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the "50X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

### 6.3. Preparation of the Sample

The specimens shall be human serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

For serum preparation, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; then allow the blood to clot and centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, they may be stored at temperatures of -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

When assayed in duplicate, 0.050 mL of the specimen is required.

For sample with concentration over 250 ng/mL dilute the sample with Calibrator 0.

### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Samples		25 µL	
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at room temperature (22±28°C) for 1 hours. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> 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 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 CEA 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. Note

The optical densities (O.D.s) of some calibrators and samples may be higher than 2.0, in such a case, they could be out of the measurement range of the microplate reader. It is therefore necessary, for O.D.s higher than 2.0, to perform a reading at 405 nm (=wavelength of peak shoulder) in addition to 450 nm

(peak wavelength) and 620 (reference filter for the subtraction of interferences due to the plastic).

For microplate readers unable to read the plate at 3 wavelengths at the same time, it is advisable to proceed as follows:

- Read the microplate at 450 nm and at 620 nm.
- Read again the plate at 405 nm and 620 nm.
- Find out the wells whose ODs at 450 nm are higher than 2.0
- Select the corresponding ODs read at 405 nm and multiply these values at 405 nm by the conversion factor 3.0 (where OD 450/OD 405 = 3.0), that is: OD 450 nm = OD 405 nm x 3.0.

Warning: The conversion factor 3.0 is suggested only. For better accuracy, the user is advised to calculate the conversion factor specific for his own reader.

The OD of calibrator 5 should be  $\geq 1.3$ .

### 8.2. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.3. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

### 8.4. 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

Nearly 99% of non-smokers have CEA concentrations less than 5 ng/ml. Similarly 99% of smokers have concentrations less than 10 ng/ml (4).

	ng/mL
<b>Non-smoker</b>	<5 ng/mL
<b>Smoker</b>	<10 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 measurements (16x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is 5.8%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (20x) of three different control sera in

different lots of kit. The between assay variability is 9.9%.

### 10.2. Accuracy

The recovery of amounts of 10 - 20 - 40 ng/mL of CEA added to samples gave an average value ( $\pm$ SD) of 100.7%  $\pm$  7.2% with reference to the original concentrations.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CEA that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.11 ng/mL at the 95% confidence limit.

### 10.4. Specificity

In order to assess the specificity of the antibody pair used for the CEA Elisa assay, massive doses of related analytes were spiked in a pool of patient sera:

Analyte	Concentration	Cross Reaction
<b>CEA</b>		100 %
<b>-HCG</b>	250 ng/mL	ND
<b>AFP</b>	5000 ng/mL	ND
<b>CA-125</b>	1000 U/mL	ND
<b>PSA</b>	1000 ng/mL	ND
<b>CA 19-9</b>	1000 U/mL	ND

### 10.5. Correlation

Diametra CEA ELISA was compared to another commercially available CEA assay. 167 serum samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.019x - 0.200$$

$$r^2 = 0.992$$

$$y = \text{CEA Predicate kit}$$

$$x = \text{CEA Diametra kit}$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## BIBLIOGRAPHY

- 1) Gold P, Freedman SO, J Exp Med , 121, 439 (1965)
- 2) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 3) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p444
- 5) Sorokin JJ, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

Ed. 01/2015

DCM051-9

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



DCM051-9  
Ed. 01/2015

# CEA ELISA

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa del antígeno carcinoembrionario CEA en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver la etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO051

## USO PREVISTO

Método inmunoenzimático directo para la determinación cuantitativa de la concentración del antígeno carcinoembrionario (CEA) en suero o plasma humano.

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

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

EL Antígeno Carcinoembriogenico (CEA) es una glicoproteína de 180 kDa, que participa en la adhesión celular. Se produce normalmente durante el desarrollo fetal, pero la producción se detenga antes del nacimiento. Por lo tanto, está normalmente presente en la sangre de los adultos sanos, aunque los niveles son mayores en los fumadores.

CEA fue identificado en muestras de tejido de cáncer de colon humano. Fue encontrado en el suero de pacientes con cáncer colorrectal y también los pacientes con otros tipos de cáncer tienen niveles elevados de CEA, como un marcador tumoral puede ser utilizado para monitorizar la respuesta al tratamiento de cáncer de colon.

CEA y genes relacionados constituyen la familia de la CEA, que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

El cáncer que más comúnmente causa un aumento en el CEA es el cáncer del colon y el recto. Otras formas de cáncer, incluyendo cáncer de páncreas, estómago, mama, pulmón y ciertos tipos de cáncer de tiroides y el cáncer de ovario tienen niveles elevados de CEA.

Las situaciones benigna en la que la CEA tiene un alto nivel, se encuentran el tabaquismo, infección, inflamación del intestino, pancreatitis, cirrosis hepática y algunos tumores benignos en los mismos órganos en los que un alto CEA indica cáncer. La radioterapia y la quimioterapia pueden causar un aumento temporal de los niveles de CEA, debido a la muerte de las células cancerosas y la liberación de CEA en el torrente sanguíneo. Los tumores benignos generalmente no causan un aumento superior a 10 ng/mL.

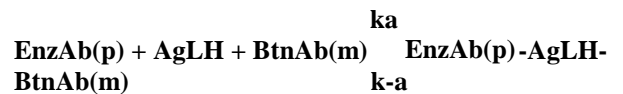
## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este método, los calibradores, muestras y/o controles (que contienen el antígeno CEA nativo), se añaden a los pocillos de la microplaca sensibilizados

con estreptavidina. A continuación, se añaden a los pocillos, en exceso, anticuerpos anti-CEA monoclonales biotinilados o bien anticuerpos conjugados con la enzima; ambos tipos de anticuerpos son de alta afinidad y especificidad, y reconocen epítomos distintos.

En los pocillos de la microplaca, la reacción entre el antígeno nativo y los anticuerpos se produce sin competencia o impedimento estérico, y se forma un complejo sándwich soluble.

La interacción se ilustra mediante la siguiente ecuación:



**BtnAb(m)** = anticuerpo biotinilado monoclonal (en exceso)

**AgLH** = antígeno nativo (cantidad variable)

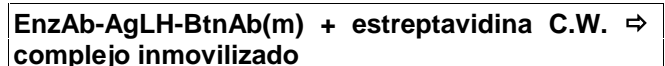
**EnzAb** = anticuerpo marcado con una enzima (en exceso)

**EnzAb-AgLH-BtnAb(m)** = complejo sándwich antígeno-anticuerpos

**k<sub>a</sub>** = constante de asociación

**k<sub>-a</sub>** = constante de disociación

Al mismo tiempo, el complejo se deposita en el pocillo mediante la reacción de alta afinidad de la estreptavidina y el anticuerpo biotinilado. Esta interacción se ilustra a continuación:



**Estreptavidina C.W.** = estreptavidina inmobilizada en el pocillo

**Complejo inmobilizado** = enlace sándwich anticuerpo-antígeno unido a la superficie

Tras lograr el equilibrio, la fracción unida del anticuerpo se separa del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad enzimática en la fracción unida del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración de antígeno nativo libre. La actividad enzimática se cuantifica mediante



la reacción con un sustrato que produce una coloración. Usando distintos calibradores de concentración conocida de antígeno se puede generar una curva dosis-respuesta con la que se puede determinar la concentración desconocida del antígeno.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

##### 1. Calibradores (6 frascos, 1 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5106-0
CAL1	REF DCE002/5107-0
CAL2	REF DCE002/5108-0
CAL3	REF DCE002/5109-0
CAL4	REF DCE002/5110-0
CAL5	REF DCE002/5111-0

##### 2. Conjugado (1 frasco, 13 mL)

Anticuerpo anti CEA conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) y anticuerpo anti CEA biotinilado

REF DCE002/5102-0

##### 3. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Estreptavidina absorbida en la microplaca

REF DCE002/5103-0

##### 4. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

##### 5. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

##### 6. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 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 3 (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 Calibradores deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de CEA de 5 ng/mL y 250 ng/mL.
- CEA posee una baja sensibilidad y especificidad clínica como marcador tumoral. Los valores altos de CEA por sí solos no tienen valor diagnóstico clínico como prueba del cáncer, por lo que únicamente pueden utilizarse junto con otras manifestaciones clínicas (observaciones) y parámetros de diagnóstico. Puede ser que los pacientes con cáncer colorrectal no muestran CEA elevado, mientras que los valores elevados de CEA no siempre cambian con la progresión o regresión de la enfermedad. Los fumadores demuestran un rango más altos de valores basales que los no fumadores.

#### 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada 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>5</sub>)

Los calibradores son listo para usar, son calibrados usando una preparación de referencia que se calibró contra 1<sup>st</sup> IRP 73/601 y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	5	10	25	50	250

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8 °C.

### 6.2. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de "Solución de lavado conc. 50X" con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL.

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2÷8°C durante al menos 30 días.

### 6.3. Preparación de la muestra

Las muestras deben ser de sangre en tipo sérico y plasmática, y es necesario observar las precauciones usuales en las muestras obtenidas por venipunción. Para una comparación precisa con los valores normales establecidos, las muestras de suero deben obtenerse en ayunas matinal.

Para el suero, la sangre debe recogerse en un tubo de venipunción sin aditivos o anticoagulantes. Deje que la sangre coagule. Centrifugue la muestra para separar el suero de las células.

Las muestras se pueden conservar refrigeradas a 2-8°C durante un máximo de 5 días. Si no es posible analizarlas en dicho periodo de tiempo, se pueden conservar a una temperatura de -20°C durante 30 días. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidos.

Para analizar duplicados se requiere 0,050 mL de la muestra.

Para muestras con concentraciones superiores a 250 ng/mL diluir la muestra con Estandar 0.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Muestra		25 µL	
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar 1h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL 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> <p><b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar a temperatura ambiente (22÷28°C) durante 15 minutos, protegida de la luz</p>			

Solución de parade	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 entre 5 minutos.			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio deberá comprobar controles con niveles de hipotiroidismo, eutiroidismo e hipertiroidismo para supervisar el rendimiento del kit. Estos controles deben tratarse como desconocidos y sus valores deben determinarse en cada procedimiento de ensayo realizado.

Se deben mantener los gráficos de control de calidad para seguir el rendimiento de los reactivos suministrados. Se deben emplear métodos estadísticos pertinentes para determinar las tendencias. Cada laboratorio debe establecer los límites de aceptabilidad del rendimiento del kit. Entre otros parámetros que se deben controlar, se incluyen las intersecciones de 80, 50 y 20% de la curva de calibración para la reproducibilidad interensayo. Además, la absorbancia máxima debe respetar los valores de las sesiones anteriores. Desviaciones significativas del rendimiento establecido pueden 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. Notas

Las densidades ópticas (DO) de algunos calibradores y muestras pueden ser superiores a 2,0. En ese caso, podrían estar fuera del rango de medición del lector de microplacas. Por lo tanto, en estos casos es necesario realizar una lectura a 405 nm (= longitud de onda de entrada pico) además de a 450 nm (longitud de onda pico) y a 620 nm (filtro de referencia para la disminución de interferencias debidas al plástico).

Si se utilizan lectores no aptos para la lectura a tres longitudes de onda simultáneamente, se recomienda realizar lo siguiente:

- leer la microplaca a 450 nm y a 620 nm.
- volver a leer la microplaca a 405 nm y a 620 nm.
- seleccionar los pocillos cuyas DO a 450 nm sean superiores a 2,0.
- seleccionar las DO correspondientes leídas a 405 nm y multiplicar estos valores a 405 nm por el factor de conversión 3,0 (donde  $DO_{450}/DO_{405} = 3,0$ ), es decir:  $DO_{450\text{ nm}} = DO_{405\text{ nm}} \times 3,0$

Advertencia: El factor de conversión 3,0 es solo una advertencia. Para mayor precisión, se recomienda calcular el factor de conversión específico del lector empleado.

La densidad óptica del estándar 5 debe ser de 5 1.3.

### 8.2. Absorbancia media

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

### 8.3. Curva de calibración

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

### 8.4. 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

Aproximadamente el 99% de los no fumadores tienen concentraciones de CEA menores de 5 ng/mL; del mismo modo el 99% de los fumadores tienen concentraciones de CEA menores de 10 ng/mL (4).

	ng/mL
No fumadores	< 5
Fumadores	< 10

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 (16x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 5,8%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (20x) la medición de tres sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 9,9%.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en muestras enriquecidas con 10 - 20 - 40 ng/mL de CEA ha dado un valor medio ( $\pm$ SE) de 100.7%  $\pm$  7.2%.

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de CEA medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,11 ng/mL con un límite de confianza del 95%.

#### 10.4. Especificidad

En el kit CEA ELISA se han utilizado anticuerpos de alta especificidad para moléculas de CEA. No se detectaron interferencias en el rendimiento del kit CEA después de añadir cantidades masivas de las siguientes sustancias a un pool de suero humano.

Analito	Concentración	Reacción cruzada
CEA		100%
bHCG	250 ng/mL	ND
AFP	5000 ng/mL	ND
CA-125	1000 U/mL	ND
PSA	1000 ng/mL	ND
CA 19-9	1000 U/mL	ND

#### 10.5. Correlación

El kit CEA ELISA Diametra (X) se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 167 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$Y = 1,019 \cdot X - 0,200$$

$$r^2 = 0,992$$

#### 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1) Gold P, Freedman SO, J Exp Med , 121, 439 (1965)
- 2) Zamcheck N, Adv Intern Med, 19, 413 (1974)
- 3) Rayncao G, Chu TM, JAMA, 220, 381 (1972)
- 4) Wild D, The Immunoassay Handbook., Stockton Press (1994) p444
- 5) Sorokin JJ, et al JAMA 228:49-53 (1974)
- 6) Mackay AM, et al Br. Med. Jr. 4:382-385 (1974)
- 7) Sikorska H, et al Cancer Detection Prev 12:321-355 (1988)
- 8) Minton JP, et al Cancer 42:1422-27 (1978)
- 9) Staab HJ, et al Am. J.Surgery 136:322-327 (1978)
- 10) Thomas P, et al Biochem Biophys Acta 1032:177-189 (1990)
- 11) Yamashita K, et al Cancer Research 47:3451-3459 (1987)
- 12) Hammerstrom S, et al Cancer Research 49:4852-58 (1989)
- 13) Ann.Inter.Med.1981;94:407-409

Ed. 01/2015

DCM051-9

**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](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



DCM055-11  
Ed. 01/2016

## CA 15-3 ELISA

per analisi di routine

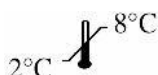
Determinazione immunoenzimatica del CA 15-3 nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO055

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del CA 15-3 nel siero o plasma umano.

Il kit CA 15-3 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

CA-15-3, è un'abbreviazione per l'antigene tumorale 15-3. I livelli di CA 15-3 sono molto utili per seguire il corso del trattamento in donne a cui è stato diagnosticato il cancro al seno, particolarmente in caso di stadi avanzati. I livelli di CA 15-3 sono raramente elevati in donne con il cancro al seno della fase iniziale.

I cancri dell'ovaia, del polmone e della prostata possono anche causare l'aumento dei livelli di CA 15-3. Livelli elevati del CA 15-3 possono essere associati a patologie benigne, quali il tumore benigno al seno o malattie ovariche, endometriosi, infiammazioni pelviche ed epatite.

La gravidanza e la lattazione possono anche indurre un aumento dei livelli di CA 15-3. Il CA 15-3 è più utile per il monitoraggio dei pazienti nella fase post-operatoria, in particolare nel caso di malattie metastatiche. Il 96% dei pazienti con ricomparsa locale e sistemica hanno elevato CA 15-3; questo dato può essere usato per predire la ricomparsa prima dei mezzi clinici e radiologici. Un incremento del 25% del CA 15-3 serico è associato ad una progressione del carcinoma. Un decremento del 50% del CA 15-3 serico è associato ad una risposta al trattamento. Il CA 15-3 è più sensibile del CEA nella diagnosi delle ricadute del tumore al seno. In combinazione con il CA 125 è utile nella diagnosi precoce del tumore alle ovaie. I livelli di CA 15-3 aumentano nei tumori al colon polmoni ed epatici.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il kit CA 15-3 ELISA è basato sulla cattura simultanea del CA 15-3 umana da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastro, l'altro coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Successivamente, l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato ( $H_2O_2$ ) ed il TMB

Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution ( $H_2SO_4$ ).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di CA 15-3 presente nel campione.

La concentrazione del CA 15-3 nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 2 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/5506-0
CAL1	REF DCE002/5507-0
CAL2	REF DCE002/5508-0
CAL3	REF DCE002/5509-0
CAL4	REF DCE002/5510-0
CAL5	REF DCE002/5511-0

2. Control (1 flacone, 2 mL)

La concentrazione del Controllo è indicata sul Certificato di Analisi

REF DCE045/5503-0

3. Serum diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugate (1 flacone, 22 mL)

Anticorpo monoclonale anti CA 15-3 coniugato a perossidasi di rafano (HRP)

REF DCE002/5502-0

5. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

Anticorpo monoclonale anti CA 15-3 adsorbito nella micropiastro

REF DCE002/5503-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

$H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido Solforico 0,15 mol/L (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 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 i reattivi a 2-8°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; 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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione del CA 15-3 da 0,5 a 240,0 U/mL.

## 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 dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una volta aperti, i Calibratori sono stabili 6 mesi a 2-8°C.

**Non diluire i Calibratori ed il Controllo; sono già stati pre-diluiti e sono pronti all'uso.**

### 6.2. 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.

### 6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma umano, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno.

Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti; lasciare coagulare il sangue; centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi

possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

**Tutti i campioni devono essere diluiti 1:50 con Serum diluent**, come nell'esempio seguente:

Siero	20 µL
Serum Diluent	980 µL

Mescolare gentilmente.

Il Controllo è pronto all'uso.

NB: per campioni con concentrazioni superiori a 240 U/mL diluire ulteriormente il campione con Sample diluent (attenzione: tenere conto di questa diluizione nel calcolo del risultato finale).

#### 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 essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campioni /Controllo	Bianco
Campioni diluiti/ Controllo		200 µL	
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	200 µL		
<p>Incubare a 37°C per 1 ora senza coprire la piastra. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare 5 volte ogni pozzetto con 0,3 mL di wash solution diluita.</p> <p><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 capovolta su fogli di carta assorbente.</p>			
Coniugato	200 µL	200 µL	
<p>Incubare a 37°C per 1 ora senza coprire la piastra. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto. Lavare 5 volte ogni pozzetto con 0,3 mL di wash solution diluita.</p> <p><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 capovolta su fogli di carta assorbente.</p>			

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubare a temperatura ambiente (22-28°C) per 15 minuti al riparo dalla luce.</p>			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>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.</p>			

#### 7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di CA 15-3 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 (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

##### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

##### 8.3. Calcolo dei risultati

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

## 9. VALORI DI RIFERIMENTO

	<b>CA 15-3</b>
Donne sane non in gravidanza	< 35 U/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.

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (15x) la misura di tre differenti sieri di controllo. La variabilità intra-assay è 7,5%.

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di cinque differenti sieri di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 11,4%.

### 10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 25 - 50 - 100 U/mL di antigene ha dato un valore medio ( $\pm$  SD) di 106,61%  $\pm$  8,86%.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 - 4 - 8 - 16 volte ha dato un valore medio ( $\pm$  SD) di 103,71%  $\pm$  8,56%.

### 10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di CA 15-3 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,40 U/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.4. Specificità

L'anticorpo impiegato presenta le seguenti reazioni crociate:

Antigene	Concentrazione	% Cross-reactivity
CA 15-3	---	100,0%
CA 125	1000 U/mL	N.D.
CA 19-9	1000 U/mL	N.D.
PSA	1000 ng/mL	N.D.
PAP	1000 ng/mL	N.D.
AFP	10000 ng/mL	N.D.
CEA	1000 ng/mL	N.D.

### 10.5. Correlazione

Il kit CA 15-3 ELISA Diametra è stato comparato con un metodo di riferimento disponibile in commercio. Sono stati testati 54 campioni di siero.

La curva di regressione è:

$$y = 0,86 x + 2,66$$

$$r^2 = 0,838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

**Manufactory:** Via Pozzuolo 14,  
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM055-11  
Ed. 01/2016

## CA 15-3 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of CA 15-3 in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C - 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO055

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CA 15-3 concentration in human serum or plasma.

CA 15-3 ELISA is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA-15-3, is an abbreviation for cancer antigen 15-3. CA 15-3 levels are most useful in following the course of treatment in women diagnosed with breast cancer, especially advanced breast cancer. CA 15-3 levels are rarely elevated in women with early stage breast cancer.

Cancers of the ovary, lung, and prostate may also raise CA 15-3 levels. Elevated levels of CA 15-3 may be associated with non-cancerous conditions, such as benign breast or ovarian disease, endometriosis, pelvic inflammatory disease, and hepatitis. Pregnancy and lactation can also cause CA 15-3 levels to rise.

CA 15-3 is most useful for monitoring patients post-operatively for recurrence, particularly metastatic diseases. 96% of patients with local and systemic recurrence have elevated CA 15-3, which can be used to predict recurrence earlier than radiological and clinical criteria. A 25% increase in the serum CA 15-3 is associated with progression of carcinoma. A 50% decrease in serum CA 15-3 is associated with response to treatment. CA 15-3 is more sensitive than CEA in early detection of breast cancer recurrence. In combination with CA-125, CA 15-3 has been shown to be useful in early detection of relapse of ovarian cancer. CA 15-3 levels are also increased in colon, lung and hepatic tumours.

### 2. PRINCIPLE

CA 15-3 ELISA test is based on simultaneous binding of human CA 15-3 to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

After incubation, the separation bound-free is obtained with a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

The colour intensity is proportional to CA 15-3 concentration in the sample.

CA 15-3 concentration in the sample is calculated using a calibration curve.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 2 mL each)

CAL0 REF DCE002/5506-0

CAL1 REF DCE002/5507-0

CAL2 REF DCE002/5508-0

CAL3 REF DCE002/5509-0

CAL4 REF DCE002/5510-0

CAL5 REF DCE002/5511-0

2. Control (1 vial, 2 mL)

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis REF DCE045/5503-0

3. Serum diluent (1 vial, 100 mL)

Phosphate buffer 50 mM pH 7.4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugate (1 vial, 22 mL)

Monoclonal antibody anti CA 15-3 conjugated with horseradish peroxidase (HRP) REF DCE002/5502-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti CA 15-3 adsorbed on microplate REF DCE002/5503-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)

REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 vial, 15 mL)

Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)

REF DCE005-0

8. 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 at 2-8°C in the dark.

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

immediately after use; once opened, the microplate 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.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300<sup>R</sup> 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/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 CA 15-3 from 0.5 to 240.0 U/mL.

#### 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.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

#### 6. PROCEDURE

##### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C

**CA 15-3 Calibrators and Control have already been pre-diluted and are ready for use.**

##### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content 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 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.

##### 6.3. Preparation of the Sample

The specimens can be human serum or plasma and the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

To obtain the serum, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; allow the blood to clot; centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Specimen can be stored at 2-8°C for at short time (max five days). For longer storage the specimen should be frozen at -20°C (max 30 days). Avoid repeated freezing and thawing.

**All the samples must be diluted 1:50 with the Serum diluent**, as in the following example:

Serum	20 µL
Serum Diluent	980 µL

Mix gently.

The Control is ready to use.

NB: for samples with concentration over 240 U/mL, dilute further the sample with the Sample diluent (attention: consider this dilution in the calculation of final result).

#### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Samples/ Control	Blank
Control / Diluted samples		200 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	200 µL		
Incubate for 1 hour at 37°C without covering the plate. Remove the content from each well. Wash the wells 5 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.			
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate for 1 hour at 37°C without covering the plate. Remove the content from each well. Wash the wells 5 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 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 CA 15-3 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>5</sub>) and of each sample.

##### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (E<sub>m</sub>) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</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 U/mL.

#### 9. REFERENCE VALUES

	CA 15-3
Non-pregnant healthy women	< 35 U/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 measurements (15x) of three different control sera in one assay. The within assay variability is 7.5%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variations was determined by replicate measurements (10x) of five different control sera in different lots of kit. The between assay variability is 11.4%.

### 10.2. Accuracy

The recovery on three serum samples spiked with 25 - 50 - 100 U/mL of antigen gave an average value ( $\pm$  SD) of 106.61%  $\pm$  8.86%.

The dilution test performed on three sera diluted 2 - 4 - 8 - 16 times gave an average value ( $\pm$ SD) of 103.71%  $\pm$  8.56%.

### 10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA 15-3 that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.40 U/mL at the 95% confidence limit.

### 10.4. Specificity

The cross reaction of the antibody are shown in the table:

Antigens	Concentration	% Cross-reactivity
CA 15-3	---	100.0%
CA 125	1,000 U/mL	N.D.
CA 19-9	1,000 U/mL	N.D.
PSA	1,000 ng/mL	N.D.
PAP	1,000 ng/mL	N.D.
AFP	10,000 ng/mL	N.D.
CEA	1,000 ng/mL	N.D.

### 10.5. Correlation

Diametra CA 15-3 ELISA kit was compared with a commercial reference method. 54 serum samples were analysed according in both test system. The linear regression curve was calculated:

$$y = 0.86x + 2.66$$

$$r^2 = 0.838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

## 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

## BIBLIOGRAPHY

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

**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)



DCM055-11  
Ed. 01/2016

## CA 15-3 ELISA

para análisis de rutina

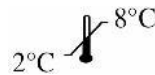
Determinación inmunoenzimática de CA 15-3 en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO055

### USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CA 15-3 en suero o plasma humano.

El kit CA 15-3 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

CA-15-3 es la abreviatura de antígeno tumoral 15-3. Los niveles de CA 15-3 son muy útiles para seguir el curso del tratamiento en mujeres a las que se les ha diagnosticado un cáncer de mama, especialmente en caso de estados avanzados. Los niveles de CA 15-3 son raramente elevados en mujeres con cáncer de mama en fase inicial. El cáncer de ovario, de pulmón y de próstata también puede causar el aumento de los niveles de CA 15-3. Los niveles elevados de CA 15-3 pueden asociarse a patologías benignas, como tumor benigno de mama o enfermedades ováricas, endometriosis, inflamaciones pélvicas y hepatitis.

El embarazo y la lactancia también pueden llevar a un aumento de los niveles de CA 15-3.

Un incremento del 25% del CA 15-3 sérico se asocia a la progresión del carcinoma. Una disminución del 50% del CA 15-3 sérico se asocia a la respuesta al tratamiento. El CA 15-3 es más sensible que el CEA en el diagnóstico de las recaídas del tumor de mama. En combinación con el CA 125, resulta útil en el diagnóstico precoz del tumor de ovario. Los niveles de CA 15-3 aumentan en los tumores de colon, pulmones y hepáticos.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo CA 15-3 ELISA se basa en la captura simultánea del CA 15-3 humano por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP). Tras un determinado período de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, la enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato TMB, desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada ( $H_2SO_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de CA 15-3 presente en la muestra. La concentración de CA 15-3 en la muestra se calcula tomando como base una curva de calibración.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

1. Calibradores (6 frascos, 2 mL cada uno)

CAL0	REF DCE002/5506-0
CAL1	REF DCE002/5507-0
CAL2	REF DCE002/5508-0
CAL3	REF DCE002/5509-0
CAL4	REF DCE002/5510-0
CAL5	REF DCE002/5511-0

2. Control (1 frasco, 2 mL)

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

REF DCE045/5503-0

3. Diluyente de suero (1 frasco, 100 mL)

Tampón fosfato 50 mM pH 7,4; BSA 1 g/L

REF DCE018/5518-0

4. Conjugado (1 frasco, 22 mL)

Anticuerpo monoclonal anti CA 15-3 conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5502-0

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo monoclonal anti CA 15-3 absorbido en la microplaca

REF DCE002/5503-0

6. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

$H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

8. 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 5 (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.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La solución de parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de CA 15-3 de 0,5 a 240,0 U/mL.

#### 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 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 parada. Tanto el sustrato como la solución de parada 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 lean 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>5</sub>)

Los Calibradores tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables durante 6 meses a 2-8 °C.

**No diluir Calibradores y Control; ya se han prediluido y son listo para usar.**

##### 6.2. 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.

##### 6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras de suero o plasma humano, y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.

Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2÷8°C durante un período máximo de 5 días. Si no

se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

**Todas las muestras deben diluirse 1:50 con el diluyente de suero**, de la siguiente manera:

Suero	20 µL
Diluyente de suero	980 µL

Mezclar con cuidado.

El Control está listo para usar.

Nota: para las muestras con concentraciones superiores a 240 U/mL diluir más la muestra con Diluyente de Muestra (atención: tener en cuenta esta dilución en el cálculo del resultado final).

#### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestras /Control	Blanco
Muestras diluidas/ Control		200 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	200 µL		
<p>Incubar a 37°C durante 1 hora sin cubrir la placa. Retirar el contenido de cada pocillo. Lavar cada pocillo 5 veces con 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>			

Conjugado	200 µL	200 µL	
<p>Incubar a 37°C durante 1 hora sin cubrir la placa. Retirar el contenido de cada pocillo. Lavar los pocillos 5 veces con 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 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), en la oscuridad.</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<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 dentro de los 5 minutos.</p>			

#### 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de CA 15-3 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 absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

	<b>CA 15-3</b>
Mujeres sanas no embarazadas	< 35 U/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 (15x) la medición de tres sueros de control distintos. La variabilidad intraensayo es 7,5%.

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de cinco sueros de control distintos con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 11,4 %.

### 10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en tres muestras enriquecidas con 25 - 50 - 100 U/mL de antígeno ha dado un valor medio (±SD) de 106,61% ± 8,86%.

La prueba de dilución conducta en tres muestras diluidas 2 - 4 - 8 - 16 veces dio una media (± DE) de 103,71% ± 8,56%

### 10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de CA 15-3 medible que puede distinguirse del Calibrador 0 es 0,40 U/mL con un límite de confianza del 95%.

## 10.4. Especificidad

El anticuerpo empleado presenta las siguientes reacciones cruzadas:

Antígeno	Concentración	% Reactividad cruzada
CA 15-3	---	100,0%
CA125	1000 U/mL	N.D.
CA19-9	1000 U/mL	N.D.
PSA	1000 ng/mL	N.D.
PAP	1000 ng/mL	N.D.
AFP	10000 ng/mL	N.D.
CEA	1000 ng/mL	N.D.

## 10.5. Correlación

El kit CA 15-3 Diametra se ha comparado con un método de referencia disponible en el mercado. Se han comprobado 54 muestras de suero. La curva de regresión es:

$$y = 0,86 x + 2,66$$

$$r^2 = 0,838$$

$$y = \text{CA 15-3 Diametra}$$

$$x = \text{CA 15-3 MODULAR (Roche)}$$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aziz DC, et al Specialty Laboratories, (1991)
- 2) Aziz DC. A J Clin Pathol 98:105-11 (1992)
- 3) Aziz DC, et al J Clin Pathol 5:422-38 (1991)
- 4) Clark GM, et al N Engl J Med 320:627-33 (1989)
- 5) Elledge RM, et al Annu Rev Med 44:201-10 (1993)
- 6) Foekens JA, et al Cancer Res 50:3832-7 (1990)
- 7) Isola J, et al J Cell Biochem (Suppl 16D):101 (1992)
- 8) Kute TE, et al Cancer Res 52:198-203 (1992)
- 9) McGuire WL, et al J Natl Cancer Inst 82:1006-7 (1990)
- 10) Nicholson S, et al Br J Cancer 63:146-50 (1991)
- 11) Somerville JE, et al J Clin Pathol 45:16-20 (1992)
- 12) Ueronese S, et al Am J Clin Pathol 95:30-4 (1991)
- 13) Lotnick M, et al Int. J. Biolog Markers 6:115 (1991)

Ed. 01/2016

DCM055-11

**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



DCM056-9  
Ed. 01/2015

## CA19-9 ELISA

per analisi di routine

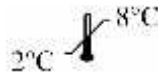
Determinazione immunoenzimatica del CA19-9 in siero o in plasma umano

IVD



LOT

Vedi etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO056

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione del CA19-9 in siero o plasma umano.

Il kit CA19-9 ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il CA19-9 è il principale marker tumorale del gruppo delle glicoproteine "tipo mucine" le quali sono state associate a patologie tumorali gastrointestinali.

La distribuzione immunohistologica del CA19-9 nei tessuti è consistente con la determinazione quantitativa delle maggiori concentrazioni di CA19-9 nei tumori rispetto a tessuti normali e infiammati.

Recenti lavori indicano che CA19-9 frequentemente mostra valori elevati in sieri di soggetti con malattie maligne gastrointestinali, come malattie pancreatiche, colon-rettali, gastriche e carcinomi epatici. Insieme con il CEA, valori elevati si hanno in neoplasie della cistifellea. Persistenti valori elevati del CA19-9 durante i trattamenti terapeutici, possono essere indicativi di metastasi occulte o di malattie residue. Questo antigene associato ai tumori può essere elevato in alcune condizioni non tumorali.

Diversi studi mostrano che i livelli sierici di CA19-9 possono essere utili nel monitorare soggetti affetti dalle patologie sopra menzionate.

Un incremento del CA19-9 è associato ad un progressivo sviluppo del tumore ed ad una scarsa risposta terapeutica. Un decremento del CA19-9 è indicativo di una prognosi favorevole e una buona risposta al trattamento. Valori elevati si hanno comunque in altre malattie non tumorali.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il CA19-9 ELISA test è basato sulla cattura del CA19-9 umano da parte di due anticorpi monoclonali, uno immobilizzato nella micropiastre, l'altro coniugato con la perossidasi (HRP).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida. Successivamente, l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato ( $H_2O_2$ ) ed il TMB-Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution ( $H_2SO_4$ ).

L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di CA19-9 presente nel campione.

La concentrazione del CA19-9 nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

##### 1. Calibrators (6 flaconi)

CAL0	(3 mL)	REF DCE002/5606-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/5607-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/5608-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/5609-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/5610-0
CAL5	(1 mL)	REF DCE002/5611-0

##### 2. Control (1 flacone, 1 mL)

La concentrazione del Controllo è riportata sul Certificato di Analisi **REF DCE045/5603-0**

##### 3. Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti CA19-9 coniugato a perossidasi di rafano (HRP) **REF DCE002/5602-0**

##### 4. Coated Microplate (1 micropiastre breakable)

Anticorpo anti CA19-9 adsorbito su micropiastre **REF DCE002/5603-0**

##### 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)

0.2M Phosphate buffer, 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 i reattivi a 20±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.

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<sup>R</sup> 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo permette la determinazione del CA19-9 da 0,2 a 240,0 U/mL.

#### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

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

##### 6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto del flacone della "10X Conc. Wash Solution" con acqua distillata fino al volume di 500 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:10. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°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.

##### 6.3. Preparazione del campione

Utilizzare campioni di siero o plasma umano, e osservare le consuete precauzioni nella raccolta di campioni provenienti da prelievo per via venosa.

Per un confronto approfondito che permetta di stabilire valori nella norma, raccogliere i campioni di siero al mattino e a digiuno. Per ottenere il siero, il sangue deve essere raccolto in un tubo da prelievo per via venosa, senza additivi o anticoagulanti. Lasciare coagulare il sangue. Centrifugare il campione per separare il siero dalle cellule.

I campioni possono essere refrigerati a 2-8°C per un periodo massimo di 5 giorni. Qualora non fosse possibile testare i campioni entro tale periodo, essi possono essere conservati a temperature di -20°C fino a 30 giorni. Evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

I campioni con concentrazioni superiori a 240 U/mL possono essere diluiti con lo Calibratori zero. Il Controllo è pronto all'uso.



#### 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 essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione /Controllo	Bianco
Campione /Controllo		100 µL	
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Incubare a 37°C per 1 ora. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 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 capovolta su fogli di carta assorbente. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare a 37°C per 1 ora. Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Lavaggi:</b> seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
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 testare i controlli interni con livelli di CA19-9 compresi nel range di basso, normale ed alto per monitorare le prestazioni del saggio. Questi controlli dovrebbero essere trattati come campioni incogniti e i valori determinati in ogni seduta. Conservare le carte di controllo qualità, per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Dovrebbero inoltre essere utilizzati pertinenti metodi statistici per verificare l'andamento. 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. Inoltre, 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 (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) e di ogni campione.

##### 8.2. Curva di calibrazione

Tracciare sul grafico delle assorbanze i valori calcolati delle estinzioni medie (Em) di ciascun Calibratore (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) in funzione delle concentrazioni. Tracciare la miglior curva passante per i punti di calibrazione (es: Four Parameter Logistic).

##### 8.3. Calcolo dei risultati

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

#### 9. VALORI DI RIFERIMENTO

	CA19-9
Uomini sani e Donne sane non in gravidanza	35 U/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.

## 10. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 10.1. Precisione

#### 10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni sierici. La variabilità intra-assay è:  $\leq 3,4\%$ .

#### 10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni sierici in differenti lotti di kit. La variabilità inter-assay è:  $\leq 6,6\%$ .

### 10.2. Sensibilità

La concentrazione minima di CA19-9 misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,18 U/mL con un limite di confidenza del 95%.

### 10.3. Specificità

La specificità del presente kit CA19-9 è stata verificata dosando le seguenti sostanze. I risultati sono mostrati nella tabella seguente:

Antigene	Concentrazione	% Cross-reattività
CA19-9	---	100,0%
CA 15-3	1000 U/mL	3,0%
CA 125	400 U/mL	Not Detect
PSA	100 ng/mL	Not Detect
PAP	1000 ng/mL	Not Detect
AFP	10000 ng/mL	Not Detect
CEA	250 ng/mL	Not Detect

### 10.4. Diluizione

N° 3 campioni sierici con livelli di CA19-9 maggiori di 100 U/mL, sono stati diluiti serialmente con lo Calibratori zero fino ad una diluizione di 1:8. Il recupero in concentrazione medio è risultato pari al 112% (s.d. = 3.1%).

### 10.5. Recupero

A n° 3 campioni sierici con bassi livelli di CA19-9, sono stati caricati con concentrazioni di 200, 100, 50, 25 e zero U/mL di CA19-9 e quindi dosati. Il recupero medio del CA19-9 aggiunto è stato pari al 92.4% (s.d. = 8.8%).

### 10.6. Correlazione

Il kit Diametra CA19-9 ELISA è stato confrontato con il sistema automatico Roche Modular, sono stati dosati 22 campioni sierici ed è stata eseguita la regressione lineare della loro concentrazione con i seguenti risultati:

$$(CA19-9 \text{ Diametra}) = 1.33 (CA19-9 \text{ Roche}) - 18.62$$
$$r^2 = 0.808$$

## 11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

## BIBLIOGRAFIA

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F, et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)

Ed. 01/2015

DCM056-9

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



DCM056-9  
Ed. 01/2015

## CA19-9 ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of CA19-9 in human serum or plasma.

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO056

### INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of CA19-9 concentration in human serum or plasma.

CA19-9 ELISA is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

CA19-9 represents the most important tumour marker of the mucin type glycoproteins group, that are associated to gastrointestinal cancer pathology.

The immunohistologic distribution of CA19-9 in tissues is consistent with the quantitative determination of higher CA19-9 concentrations in cancer than in normal or inflamed tissues. Recent reports indicate that the serum CA19-9 level is frequently elevated in the serum of subjects with various gastrointestinal malignancies, such as pancreatic, colorectal, gastric and hepatic carcinomas. Together with CEA, elevated CA19-9 is suggestive of gall bladder neoplasm in the setting of inflammatory gall bladder disease. This tumour-associated antigen may also be elevated in some non-malignant conditions.

It has been shown that a persistent elevation in serum CA19-9 value following treatment may be indicative of occult metastatic and/or residual disease. Research studies demonstrate that serum CA19-9 values may have utility in monitoring subjects with the above-mentioned diagnosed malignancies.

A persistently rising serum CA19-9 value may be associated with progressive malignant disease and poor therapeutic response. A declining CA19-9 value may be indicative of a favourable prognosis and good response to treatment.

### 2. PRINCIPLE

CA19-9 ELISA test is based on simultaneous binding of human CA19-9 to two monoclonal antibodies, one immobilized on microwell plates, the other conjugated with horseradish peroxidase (HRP). After incubation, the separation bound-free is obtained with a simple solid-phase washing. Then, the enzyme in the bound-fraction reacts with the Substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) is added.

The colour intensity is proportional to CA19-9 concentration in the sample. CA19-9 concentration in the sample is calculated using a calibration curve.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. Calibrators (6 vials)

CAL0 (3 mL)	REF DCE002/5606-0
CAL1 (1 mL)	REF DCE002/5607-0
CAL2 (1 mL)	REF DCE002/5608-0
CAL3 (1 mL)	REF DCE002/5609-0
CAL4 (1 mL)	REF DCE002/5610-0
CAL5 (1 mL)	REF DCE002/5611-0

##### 2. Control (1 vial, 1 mL)

The concentration of the Control is lot-specific and is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/5603-0

##### 3. Conjugate (1 vial, 12 mL)

Antibody anti CA19-9 conjugated with horseradish peroxidase (HRP)

REF DCE002/5602-0

##### 4. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Antibody anti CA19-9 adsorbed on microplate

REF DCE002/5603-0

##### 5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-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)

0.2M Phosphate buffer, 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 at 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. Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilised

#### 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<sup>R</sup> as preservative. 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/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 CA19-9 from 0.2 to 240.0 U/mL.

#### 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 reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

#### 6. PROCEDURE

##### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

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

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

Once opened, the Calibrators are stable 6 months at 2-8°C

##### 6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the content of the vial "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 complete dissolution of the crystals; for greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL taking care also to transfer the crystals, then mix until crystals are completely dissolved.

##### 6.3. Preparation of the Sample

The specimens shall be human serum or plasma; the usual precautions in the collection of venipuncture samples should be observed.

For accurate comparison to established normal values, a fasting morning serum sample should be obtained.

For serum preparation, the blood should be collected in a venipuncture tube without additives or anti-coagulants; then allow the blood to clot and centrifuge the specimen to separate the serum from the cells.

Samples may be refrigerated at 2-8°C for a maximum period of 5 days. If the specimens cannot be assayed within this time, the samples may be stored at -20°C for up to 30 days. Avoid repetitive freezing and thawing.

For sample with concentration over 240 U/mL, dilute the sample with the Calibrator 0.

The Control is ready to use.

##### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Sample/ Control		100 µL	
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Incubation 1 h at +37°C. Remove the contents from each well; wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubation 1 h at +37°C. Remove the contents from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. <b>Washing:</b> follow the same indications of the previous point.			
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 CA19-9 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) and of each sample.

### 8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C<sub>0</sub>-C<sub>5</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 U/mL.

## 9. REFERENCE VALUES

	CA19-9
Healthy people (male and non-pregnant females)	35 U/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 (10x) the measurement of three different control sera in one assay. The within assay variability is ≤ 3.4%.

#### 10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different control sera with different lots of kit. The between assay variability is ≤ 6.6%.

### 10.2. Sensitivity

The lowest detectable concentration of CA19-9 that can be distinguished from the Calibrator zero is 0.18 U/mL at the 95 % confidence limit.

### 10.3. Specificity

The cross-reaction of the CA19-9 assay was assessed by measuring apparent dose of various potentially cross-reagents. The results are shown in the following table:

Antigens	Concentration	% Cross-reactivity
CA19-9	---	100.0%
CA 15-3	1,000 U/mL	3.0%
CA 125	400 U/mL	Not Detected
PSA	100 ng/mL	Not Detected
PAP	1,000 ng/mL	Not Detected
AFP	10,000 ng/mL	Not Detected
CEA	250 ng/mL	Not Detected

Ed. 01/2015

DCM056-9

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

#### 10.4. Dilution

Three patient serum samples containing concentrations of CA19-9 up to 100 IU/mL, were serially diluted with Calibrator zero provided in the kit up to a dilution of 8 and assayed.

The percentage of the mean of recovered dose are 112% (s.d. 3.1%).

#### 10.5. Recovery

Three normal serum samples were spiked with 200, 100, 50, 25 and 0 U/mL of CA19-9 and then assayed.

The percentage of the mean of recovered dose is 92.4% (s.d. 8.8%).

#### 10.6. Correlation

CA19-9 ELISA assay was compared to an established method using Roche Modular; 22 serum samples were assayed with both methods.

A linear regression analysis was performed and the following results were obtained:

(CA19-9 Diametra) = 1.33 (CA19-9 Roche) -18.62  
 $r^2 = 0.808$

### 11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

### BIBLIOGRAPHY

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F, et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)



DCM056-9  
Ed. 01/2015

## CA19-9 ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática de CA19-9 en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



Σ = 96 ensayos

REF DKO056

### USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de CA19-9 en suero o plasma humano.

El kit CA19-9 ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El CA19-9 es el principal marcador tumoral del grupo de las glicoproteínas "tipo mucinas", que se han asociado a patologías tumorales gastrointestinales.

La distribución inmunohistoquímica de CA19-9 en el tejido es consistente con la determinación cuantitativa de las mayores concentraciones de CA19-9 en los tumores en comparación con el tejido normal y se inflama.

Trabajos recientes indican que CA19-9 frecuentemente muestra valores elevados en sueros de individuos con enfermedades malignas gastrointestinales, como enfermedades pancreáticas, colorrectales, gástricas y carcinomas hepáticos.

Junto con CEA, se encuentran valores elevados en neoplasias de la vesícula biliar; algunos estudios han demostrado que este antígeno resulta útil para supervisar esta enfermedad.

Valores elevados persistentes de CA19-9 durante los tratamientos terapéuticos pueden indicar metástasis ocultas o enfermedades residuales.

El incremento de CA19-9 se asocia a un desarrollo progresivo del tumor y a una mala respuesta terapéutica. La reducción de CA19-9 indica un pronóstico favorable y una buena respuesta al tratamiento. Sin embargo, se observan valores elevados en otras enfermedades no tumorales.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo CA19-9 ELISA se basa en la captura del CA19-9 humano por parte de dos anticuerpos monoclonales, uno inmovilizado en la microplaca y el otro conjugado con peroxidasa (HRP).

Tras los períodos de incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

Por lo último, la enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato ( $H_2O_2$ ) y el sustrato TMB, desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la Solución de parada ( $H_2SO_4$ ).

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de CA19-9 presente en la muestra. La concentración de CA19-9 en la muestra se calcula tomando como base una curva de calibración.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

##### 1. Calibradores (6 frascos)

CAL0	(3 mL)	REF DCE002/5606-0
CAL1	(1 mL)	REF DCE002/5607-0
CAL2	(1 mL)	REF DCE002/5608-0
CAL3	(1 mL)	REF DCE002/5609-0
CAL4	(1 mL)	REF DCE002/5610-0
CAL5	(1 mL)	REF DCE002/5611-0

##### 2. Control (1 frasco, 1 mL)

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

REF DCE045/5603-0

##### 3. Conjugado (1 frasco, 12 mL)

Anticuerpo anti CA19-9 conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)

REF DCE002/5602-0

##### 4. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti CA19-9 absorbido en la microplaca

REF DCE002/5603-0

##### 5. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

$H_2O_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)

REF DCE004-0

##### 6. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (evitar el contacto con la piel)

REF DCE005-0

##### 7. Solución de lavado conc. 10X (1 frasco, 50 mL)

0.2M Tampón fosfato, 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 20± 0,5 °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.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

## 4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclín 300<sup>R</sup> como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite la determinación de CA19-9 de 0,2 a 240,0 U/mL.

## 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 marcadas. 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 la metodología aplicada haya sido debidamente validada.
- Un lavado incompleto o impreciso y la aspiración insuficiente del líquido de los micropozos 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 placa.
- Al añadir el Sustrato TMB se inicia una reacción cinética que termina al agregar la Solución de Parada. Tanto el Sustrato TMB como la Solución de Parada 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>5</sub>)

Los Calibradores están listos para usarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
U/mL	0	15	30	60	120	240

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables durante 6 meses a 2-8°C.

### 6.2. 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.

### 6.3. Preparación de la muestra

Usar muestras de suero o plasma humano, y observar las precauciones habituales en la recogida de muestras obtenidas por vía venosa.



Obtener las muestras de suero por la mañana y en ayunas para una comparación precisa que permita establecer valores normales.

Para obtener el suero, la sangre se debe recoger en un tubo de extracción por vía venosa, sin aditivos ni anticoagulantes; dejar que la sangre se coagule; centrifugar las muestras para separar el suero de las células.

Las muestras pueden conservarse a una temperatura de 2-8°C durante un período máximo de 5 días. Si no se van a usar en este período, pueden conservarse a una temperatura de -20°C durante 30 días como máximo. No volver a congelar las muestras una vez descongeladas.

Las muestras con concentraciones superiores a 240 U/mL pueden diluirse con Calibrador cero.

El Control está listo para usar.

#### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra /Control	Blanco
Muestra /Control		100 µL	
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
<p>Incubar a 37°C durante 1 hora. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL 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> <p><b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar a 37°C durante 1 hora. Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p>			

<b>Lavados:</b> siga las mismas instrucciones del punto anterior.			
Substrato TMB	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
<p>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 entre 5 minutos.</p>			

## 7. CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe analizar las muestras a niveles de los rangos bajo, medio y alto de CA19-9 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 absorbancia media (E<sub>m</sub>) de cada punto de la curva de calibración (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) y de cada muestra.

### 8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (E<sub>m</sub>) de cada Calibrador (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

### 8.3. Cálculo de los resultados

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

## 9. VALORES DE REFERENCIA

	CA19-9
Hombres sanos y mujeres sanas no embarazadas	35 U/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 (10x) la medición de tres muestras séricas distintas. La variabilidad intraensayo es:  $\leq 3,4\%$ .

#### 10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras séricas distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es:  $\leq 6,6\%$ .

### 10.2. Sensibilidad

La concentración mínima de CA19-9 medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 0,18 U/mL con un límite de confianza del 95%.

### 10.3. Especificidad

La especificidad del presente kit CA19-9 se ha comprobado analizando las siguientes sustancias. No se ha detectado ninguna reacción cruzada con las concentraciones indicadas.

Antígeno	Concentración	% Reactividad cruzada
CA19-9	---	100,0%
CA15-3	1000 U/mL	3,0%
CA125	400 U/mL	No detectada
PSA	100 ng/mL	No detectada
PAP	1000 ng/mL	No detectada
AFP	10000 ng/mL	No detectada
CEA	250 ng/mL	No detectada

### 10.4. Dilución

Tres muestras séricas con niveles de CA19-9 superiores a 100 U/mL se han diluido en serie con Calibrador cero hasta una dilución de 1:8. La recuperación de la concentración media ha resultado igual al 112% (S.D. = 3,1%).

### 10.5. Recuperación

Se han cargado tres muestras séricas con niveles bajos de CA19-9 con concentraciones de 200; 100;

50; 25 y 0 U/mL de CA19-9 y, a continuación, se han analizado. La recuperación media del CA19-9 añadido ha resultado igual al 92,4% (S.D. = 8,8%).

### 10.6. Correlación con otros métodos

El método DiaMetra CA19-9 ELISA se ha comparado con el sistema automático Roche Modular; se han analizado una serie de muestras séricas y se ha realizado la regresión lineal de la concentración de estas con los siguientes resultados:

$$(CA19-9 \text{ Diametra}) = 1,33 \cdot (CA19-9 \text{ Roche}) - 18,62$$
$$r^2 = 0,808$$

## 11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Glenn J., et al J. Clin. Oncol. 6:462-8 (1988)
2. Hayakawa T., et al Cancer 61:1827-31 (1988)
3. Koprowski H., et al Science 212:53-5 (1981)
4. Malesci A., et al Gastroenterology 92:60-7 (1987)
5. Safi F, et al Pancreas 2:398-403 (1987)
6. Steinberg W. Am J. of Gastroenterology 85:350-355 (1990)
7. Steinberg W.M., et al Gastroenterology 90:343-9 (1986)
8. Takasaki H., et al Cancer Res. 48:1435-8 (1988)
9. Tatsuta M., et al Cancer 56:2669-73 (1985)
10. Wang T.H. et al Pancreas 1:219-23 (1986)
11. Strom BL, et al Int. J. Cancer 45:821 (1990)

Ed. 01/2015

DCM056-9

**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](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		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		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		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



DCM115-5  
Ed. 01/2015

## Anti TG ELISA

per analisi di routine

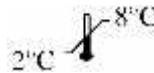
Determinazione quantitativa degli anticorpi contro la Tireoglobulina (TG) nel siero o nel plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



Σ = 96 test

REF DKO115

### DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico indiretto per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'Anti-Tg in siero o plasma umano.

Il kit Anti TG ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

La Tireoglobulina (Tg) è una proteina espressa ed impiegata interamente all'interno della ghiandola tiroide. La tireoglobulina è coinvolta nella sintesi degli ormoni tiroidei, della tiroxina (T4) e della triiodotironina (T3).

La sintesi della tireoglobulina è stimolata al livello trascrizionale dall'ormone TSH.

La tireoglobulina (Tg) è uno dei target degli autoanticorpi coinvolti nel processo autoimmune della tiroide (malattia di Graves e di Hashimoto).

Gli anticorpi Anti-Tg principalmente appartengono all'isoforma IgG. Livelli bassi e moderati degli anticorpi anti-Tg possono essere presenti in sieri di pazienti con malattie autoimmunitarie (per esempio lupus o sindrome di Sjogren). In alcuni casi sieri positivi all'anti-Tg possono risultare negativi per l'altro tipo di autoanticorpi della tiroide - anti-TPO.

Di conseguenza, la determinazione di entrambi i tipi di anticorpi tiroidei (anti-TPO + anti-Tg) fornisce una maggiore sensibilità diagnostica.

Gli anticorpi anti-Tg possono svilupparsi anche in pazienti che soffrono di cancro della tiroide.

L'elevato livello di anti-Tg in tali pazienti può interferire con la determinazione corretta della tireoglobulina serica che serve da indicatore del tumore nel controllo della terapia in questo gruppo di pazienti.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio immunoenzimatico del sandwich. Il campione da testare viene incubato nella micropiastroa coattata con l'antigene.

Gli anticorpi contenuti del campione si legano agli antigeni presenti sulla superficie della micropiastroa. Il materiale non legato è rimosso con una procedura di lavaggio.

Un secondo anticorpo anti-IgG umano coniugato con perossidasi viene messo a incubare nei pozzetti.

Dopo il successivo lavaggio viene determinata e quantificata la rimanente attività enzimatica legata alla superficie dei pozzetti mediante l'aggiunta del substrato cromogeno e della stop solution e mediante lettura a 450 nm. La densità ottica nei pozzetti è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1,2 mL ciascuno)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

CAL0

REF DCE002/11506-0

CAL1

REF DCE002/11507-0

CAL2

REF DCE002/11508-0

CAL3

REF DCE002/11509-0

CAL4

REF DCE002/11510-0

CAL5

REF DCE002/11511-0

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

Negative Control

REF DCE045/11501-0

Positive Control

REF DCE045/11502-0

3. Sample Diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgG coniugato con perossidasi di rafano (HRP), BSA 0,1%, Proclin <0,0015%

REF DCE002/11502-0

5. Coated Microplate (1 micropiastroa breakable)

Tireoglobulina antigenica adsorbita su micropiastroa

REF DCE002/11503-0

6. 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

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

0,15M acido solforico (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

#### 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 5 (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.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- 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 Calibratori e i Controlli 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.

#### 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.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi**

**effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato, di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; **questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso**.

A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	2	4	8	32	128

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

##### 6.2 Preparazione del campione

La matrice di elezione per la determinazione degli anticorpi anti-Tg è siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent**; ad esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare.

Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati.

Non usare campioni microbiologicamente contaminati, così come campioni altamente lipemici o emolizzati. I controlli sono pronti all'uso.

### 6.3 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controlli	Bianco
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Lavaggi:</b> seguire le stesse indicazioni del punto precedente..			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperatura ambiente (22-28°C).			
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. RISULTATI

### 7.1. Curva di calibrazione

Per il kit Anti TG il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-Tg. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

CAL	OD1	OD2	media	C1	C2	media	CV%
0	0.025	0.032	0.0285	0.045	0	0.0225	141,42
1	0.231	0.24	0.2355	1.88	2.12	2	8,49
2	0.429	0.442	0.4355	3.96	4.2	4.08	4,16
3	0.767	0.759	0.763	8.2	7.77	7.985	3,81
4	1.884	2.065	1.9745	31.9	32.36	32.13	1,01
5	3.190	3.316	3.253	128.2	127.5	127.85	0,39

## 8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-Tg:

	Anti TG [AU/mL]
Normale	< 4
Elevato	4

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.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di Anti-Tg serica.



## 9. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 9.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 66 sieri (di cui 27 positivi e 39 negativi) hanno mostrato una specificità del 94,9%.

### 9.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 66 sieri (di cui 27 positivi e 39 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 96,3%.

### 9.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-Tg che può essere distinta dallo Calibratori zero è di circa 0,11 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

## 10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

---

## BIBLIOGRAFIA

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

Ed. 01/2015

DCM115-5

**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)



DCM115-5  
Ed. 01/2015

## Anti TG ELISA

for routine analysis

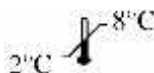
Quantitative determination of antibodies against Thyroglobulin (TG) in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



Σ = 96 tests

REF DKO115

### INTENDED USE

Indirect Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Anti-Tg concentration in human serum or plasma.

Anti TG ELISA kit is intended for laboratory use only.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Thyroglobulin (Tg) is a protein produced by and used entirely within the thyroid gland. Thyroglobulin is used by the thyroid gland to produce the thyroid hormones thyroxine (T4) and triiodothyronine (T3).

Thyroglobulin synthesis is stimulated at the transcriptional level by thyroid-stimulating hormone (TSH). Thyroglobulin (Tg) is a well-known target for autoantibodies occurring in thyroid autoimmunity (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). Anti-Tg antibodies mostly belong to the IgG class. Low to moderate levels of anti-Tg antibodies can be found in sera of other autoimmune patients (eg systemic lupus erythematosus or Sjogren syndrome). In some cases anti-Tg positive sera may show negativity for other type of anti-thyroid antibodies - anti-TPO.

Therefore, combined determination of both types of anti-thyroid antibodies (anti-TPO + anti-Tg) provides most sensitive laboratory diagnostic tool for thyroid autoimmunity. Separately from autoimmunity, anti-Tg antibodies may develop in patients suffering from thyroid cancer. High level of anti-Tg in such patients may interfere with correct determination of serum thyroglobulin, which serves as tumour marker for therapy control in this group of patients.

### 2. PRINCIPLE

This test is based on a two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated with the antigen. Antibodies from the specimen bind to the coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by the washing procedure. A second antibody directed towards human IgG and labeled with peroxidase enzyme is then added into the microwells. After the subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of a chromogen substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of specific antibodies in the specimen.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

- Calibrators** (6 vials, 1.2 mL each)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1%, human serum  
CAL0 **REF DCE002/11506-0**  
CAL1 **REF DCE002/11507-0**  
CAL2 **REF DCE002/11508-0**  
CAL3 **REF DCE002/11509-0**  
CAL4 **REF DCE002/11510-0**  
CAL5 **REF DCE002/11511-0**
- Controls** (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1%, human serum  
Negative Control **REF DCE045/11501-0**  
Positive Control **REF DCE045/11502-0**
- Sample Diluent** (1 vial, 100 mL)  
Phosphate buffer 0.1M, NaN<sub>3</sub> <0.1% **REF DCE053-0**
- Conjugate** (1 vial, 15 mL)  
Anti h-IgG conjugated with horseradish peroxidase (HRP), BSA 0.1%, Proclin <0.0015% **REF DCE002/11502-0**
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)  
Microplate coated with antigenic Thyroglobulin **REF DCE002/11503-0**
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact) **REF DCE004/-0**
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)  
0.15M Sulfuric acid (avoid any skin contact) **REF DCE005-0**
- 50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

#### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

#### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

#### Notes

Store all reagents between 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (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.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- 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 Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) or Proclin 300<sup>R</sup> as preservatives. 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.

#### 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.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding contamination of the conjugate; **this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips.**

For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

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

#### 6. PROCEDURE

##### 6.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators are ready to use and have the following concentration:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	2	4	8	32	128

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

##### 6.2. Preparation of the Sample

For determination of Anti-Tg human serum or plasma are the preferred sample matrix.

**Serum samples have to be prediluted with sample diluent 1:100;** for example, 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2-8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Do not use microbiologically contaminated samples, as highly lipemic or hemolyzed samples.

The Controls are ready to use.

##### 6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50X) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

#### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample or Controls	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the content from each well, wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. <b>Washing:</b> follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
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. RESULTS

### 7.1. Calibration curve

For Anti TG ELISA kit a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. We recommend using a Lin-Log curve.

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

### Typical Results (example only)

The figures below show typical results for Anti-Tg. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

CAL	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
0	0.025	0.032	0.0285	0.045	0	0.0225	141,42
1	0.231	0.24	0.2355	1.88	2.12	2	8,49
2	0.429	0.442	0.4355	3.96	4.2	4.08	4,16
3	0.767	0.759	0.763	8.2	7.77	7.985	3,81
4	1.884	2.065	1.9745	31.9	32.36	32.13	1,01
5	3.190	3.316	3.253	128.2	127.5	127.85	0,39

## 8. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-Tg tests:

	Anti TG [AU/mL]
Normal	< 4
Elevated	4

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.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti-Tg.

## 9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 9.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 66 sera (27 of them positive sera and 39 negative sera) shows a 94.9% specificity.

### 9.2. Sensibility

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 66 sera (27 of them positive sera and 39 negative sera) shows a 96.3% sensibility.

### 9.3. Detection limit

The lowest concentration of anti Tg that can be distinguished from Calibrator 0 is about 0.11 AU/mL with a confidence limit of 95%.

## 10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

---

## BIBLIOGRAPHY

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

**Ed. 01/2015**

**DCM115-5**

**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 SPELLLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)



DCM115-5  
Ed. 01/2015

## Anti TG ELISA

para análisis de rutina

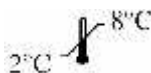
Determinación cuantitativa de los anticuerpos contra la Tiroglobulina (TG) en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  ensayos

REF DKO115

### USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico indirecto para la determinación cuantitativa de la concentración de anti-Tg en suero o plasma humano.

El kit Anti TG ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

### 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La tiroglobulina (Tg) es una proteína que se encuentra y se emplea en su totalidad dentro de la glándula tiroides. La tiroglobulina está involucrada en la síntesis de las hormonas tiroideas, de la tiroxina (T4) y de la triyodotironina (T3).

La síntesis de la tiroglobulina se estimula a nivel transcripcional por la hormona TSH.

La tiroglobulina (Tg) es uno de los objetivos de los autoanticuerpos involucrados en el proceso autoinmunitario de la tiroides (enfermedad de Graves y de Hashimoto).

Los anticuerpos anti-Tg principalmente pertenecen a la isoforma IgG. Se pueden encontrar niveles bajos y moderados de los anticuerpos anti-Tg en sueros de pacientes con enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, lupus o síndrome de Sjögren). En algunos casos, sueros positivos para anti-Tg pueden resultar negativos para el otro tipo de autoanticuerpos de la tiroides - anti-TPO.

Como consecuencia, la determinación de ambos tipos de anticuerpos tiroideos (anti-TPO + anti-Tg) proporciona una mayor sensibilidad diagnóstica.

Los anticuerpos anti-Tg pueden desarrollarse también en pacientes que sufren de cáncer de tiroides.

El alto nivel de anti-Tg en estos pacientes puede interferir en la determinación correcta de la tiroglobulina sérica, que sirve como indicador del tumor en el control de la terapia en este grupo de pacientes.

### 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo se basa en el principio inmunoenzimático del sándwich. La muestra que se va a comprobar se incuba en la microplaca recubierta con el antígeno.

Los anticuerpos contenidos en la muestra se unen a los antígenos presentes en la superficie de la microplaca. El material no unido se retira mediante un procedimiento de lavado.

Un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa se deja incubar en los pocillos.

Tras el lavado posterior, se determina y se cuantifica la actividad enzimática remanente unida a la superficie de los pocillos mediante la adición del sustrato cromógeno y de la Solución de parada, y mediante la lectura a 450 nm. La densidad óptica en los pocillos es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra.

### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

- Calibradores** (6 frascos, 1,2 mL cada uno)  
Tampón fosfato 0,1 M,  $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ , suero humano  
CAL0 REF DCE002/11506-0  
CAL1 REF DCE002/11507-0  
CAL2 REF DCE002/11508-0  
CAL3 REF DCE002/11509-0  
CAL4 REF DCE002/11510-0  
CAL5 REF DCE002/11511-0
- Controles** (2 frascos, 1,2 mL cada uno, listo para usar)  
Tampón fosfato 0,1 M,  $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ , suero humano  
Control negativo REF DCE045/11501-0  
Control positivo REF DCE045/11502-0
- Diluyente de muestra** (1 frasco, 100 mL)  
Tampón fosfato 0,1 M,  $\text{NaN}_3 < 0,1\%$  REF DCE053-0
- Conjugado** (1 frasco, 15 mL)  
Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP),  
BSA 0,1%, Proclin  $< 0,0015\%$  REF DCE002/11502-0
- Microplaca recubierta** (1 microplaca rompible)  
Microplaca con tiroglobulina antigénica absorbida  
REF DCE002/11503-0
- Substrato TMB** (1 frasco, 15 mL)  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE004-0
- Solución de parada** (1 frasco, 15 mL)  
0,15 M ácido sulfúrico (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE005-0
- Solución de lavado 50X** (1 frasco, 20 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

#### 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).

#### Notas

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

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el 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.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- 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 Calibradores y los Controles 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, usada como conservante, 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 parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

#### 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 marcadas. 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.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa adecuadamente, podría contaminarse por agentes externos;** se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad

necesaria exacta de conjugando y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la flúidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso**. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- 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 parada. Tanto el sustrato como la Solución de parada 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>5</sub>)

El sistema de medición está calibrado en unidades relativas arbitrarias. Los Calibradores son listo para usar y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	2	4	8	32	128

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables durante 6 meses a 2-8°C.

##### 6.2. Preparación de la muestra

Las matrices de elección para la determinación de los anticuerpos anti-Tg son suero o plasma humano. **Todas las muestras de suero deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras;** por ejemplo 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras.

Los pacientes no deben necesariamente estar en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial. Recoger la sangre mediante extracción venosa en un Vacutainer y separar el suero (tras la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugado.

Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación

más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, las muestras deberían dividirse en alícuotas. No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas.

Los controles son listo para usar.

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Controles	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL 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> <p><b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Conjugado	100 µL	100 µL	
<p>Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 3 veces con 300 µL de solución de lavado diluida.</p> <p><b>Lavados:</b> siga las mismas instrucciones del punto anterior.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL

Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar la microplaca con cuidado.</p> <p>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. RESULTADOS

### 7.1. Curva de calibración

Para anti-Tg, el método de elección para el tratamiento de los resultados es un procesamiento de 4 parámetros con ejes lin-log para la densidad óptica y la concentración respectivamente. Además, se pueden usar una aproximación spline y coordenadas log-log. Sin embargo, se recomienda usar una curva Lin-Log.

En primer lugar, calcular la media de las densidades ópticas relativas a los calibradores. Usar una hoja de papel lin-log y trazar las densidades ópticas medias de cada calibrador frente a la respectiva concentración. Dibujar la curva que mejor se aproxime a todos los puntos de calibración. Los puntos de los calibradores también pueden unirse con segmentos de línea recta. La concentración de las muestras desconocidas puede determinarse por interpolación de la curva de calibración.

Resultados típicos (se deben considerar solo como ejemplo)

La tabla que aparece a continuación muestra los resultados típicos para el ensayo Anti-Tg. Los datos deben considerarse como ejemplo y no deben usarse para el cálculo de los resultados.

CAL	DO1	DO2	media	C1	C2	media	CV%
0	0.025	0.032	0.0285	0.045	0	0.0225	141,42
1	0.231	0.24	0.2355	1.88	2.12	2	8,49
2	0.429	0.442	0.4355	3.96	4.2	4.08	4,16
3	0.767	0.759	0.763	8.2	7.77	7.985	3,81
4	1.884	2.065	1.9745	31.9	32.36	32.13	1,01
5	3.190	3.316	3.253	128.2	127.5	127.85	0,39

## 8. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo Anti-Tg:

	Anti TG [AU/mL]
Normal	< 4
Alto	4

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.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda



que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de anti-Tg sérica.

## **9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

### **9.1 Especificidad**

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 66 sueros (27 positivos y 39 negativos) han mostrado una especificidad del 94,9%.

### **9.2 Sensibilidad**

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 66 sueros (27 positivos y 39 negativos) han mostrado una sensibilidad del 96,3%.

### **9.3 Límite de detección**

La concentración mínima de anti-Tg que puede distinguirse del Calibrator cero es de aproximadamente 0,11 AU/mL con un límite de confianza del 95%.

## **10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN**

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

**Ed. 01/2015**

**DCM115-5**

**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 SPELLLO (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



DCM116-6  
Ed. 01/2015

# Anti TPO ELISA

per analisi di routine

Determinazione quantitativa degli anticorpi contro la tiroperossidasi (TPO) nel siero o plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO116

## DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'Anti-TPO in siero o plasma umano.

Il kit Anti TPO ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

## 1. SIGNIFICATO CLINICO

Gli anticorpi Anti-TPO (detti anche anticorpi microsomiali della tiroide) sono diretti contro la perossidasi della tiroide (TPO) situata nel reticolo endoplasmico liscio delle cellule della tiroide.

La perossidasi della tiroide o Tiroperossidasi (TPO) è un enzima principalmente espresso nella tiroide che permette l'aggiunta dello iodio sui residui tirosinici della tiroglobulina per la sintesi della tiroxina (T4) o della triiodotironina (T3) (ormoni tiroidei).

Nelle malattie autoimmunitarie, il sistema immunitario libera gli anticorpi che attaccano erroneamente l'organismo quale, ad esempio, la perossidasi della tiroide.

Gli Anticorpi che attaccano la ghiandola tiroidea causano l'infiammazione e la disfunzione della tiroide.

La presenza degli anticorpi del anti-TPO nel siero è associata con le malattie autoimmuni della tiroide (malattia di Graves e di Hashimoto). Gli anticorpi Anti-TPO sono di classe IgG.

Livelli bassi degli anticorpi anti-TPO nel siero possono essere trovati nelle patologie autoimmuni (per esempio lupus o sindrome di Sjogren) e, raramente, negli individui sani apparentemente (particolarmente in donne anziane). Il dosaggio degli anticorpi di Anti-TPO è un metodo di diagnosi sensibile delle malattie autoimmunitarie della tiroide piuttosto che gli anticorpi anti-tiroglobulina (anti-TG). Tuttavia, in alcuni casi i sieri positivi anti-TG possono essere negativi per anti-TPO. Di conseguenza, la determinazione di entrambi i tipi di anticorpi antitiroide (anti-TPO + anti-TG) fornisce una diagnosi di laboratorio più sensibile per l'autoimmunità della tiroide.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test è basato sul principio immunoenzimatico del sandwich. Il campione da testare viene incubato nella micropiastro coattata con l'antigene.

Gli anticorpi contenuti del campione si legano agli antigeni presenti sulla superficie della micropiastro. Il materiale non legato è rimosso con una procedura di lavaggio.

Un secondo anticorpo anti-IgG umane coniugato con perossidasi viene messo a incubare nei pozzetti.

Dopo il successivo lavaggio, viene determinata e quantificata la rimanente attività enzimatica legata alla superficie dei pozzetti mediante l'aggiunta del substrato cromogeno e della stop solution e mediante lettura a 450 nm. La densità ottica nei pozzetti è direttamente proporzionale alla quantità di anticorpi specifici presenti nel campione.

## 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, 1,2 mL ciascuno)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

CAL0

REF DCE002/11606-0

CAL1

REF DCE002/11607-0

CAL2

REF DCE002/11608-0

CAL3

REF DCE002/11609-0

CAL4

REF DCE002/11610-0

CAL5

REF DCE002/11611-0

2. Controls (2 flaconi, 1,2 mL ciascuno, pronti all'uso)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%, siero umano

Controllo Negativo

REF DCE045/11601-0

Controllo Positivo

REF DCE045/11602-0

3. Sample diluent (1 flacone, 100 mL)

Tampone fosfato 0,1M, NaN<sub>3</sub> <0,1%

REF DCE053-0

4. Conjugate (1 flacone, 15 mL)

Anti h-IgG coniugato con perossidasi, BSA 0,1%, Proclin <0,0015%

REF DCE002/11602-0

5. Coated Microplate (1 micropiastro breakable)

Micropiastro con Tiroperossidasi antigenica adsorbita

REF DCE002/11603-0

6. 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

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15M (evitare il contatto con la pelle)

REF DCE005-0

8. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L

REF DCE006-0

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

### 3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

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 5 (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 Calibratori ed i Controlli devono essere maneggiati come materiali potenzialmente infettivi.
- Materiali di origine animale usati per la preparazione di questo kit sono stati ottenuti da animali sani e le proteine bovine sono state ottenute da paesi non affetti da BSE, ma comunque questi materiali dovrebbero essere usati come potenzialmente contagiosi.
- 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.

#### 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.
- **ATTENZIONE: il reagente Coniugato è stato studiato per garantire la massima sensibilità di dosaggio, e pertanto, se non opportunamente usato, può essere contaminato da agenti esterni**; si raccomanda pertanto di utilizzare consumabili (puntali, flaconi, vaschette ecc.) usa e getta. Per dosaggi frazionati, prelevare l'esatta quantità di coniugato necessaria ed evitare di re-introdurre l'eventuale scarto nel flacone originale. Inoltre, **per dosaggi effettuati con l'ausilio di strumentazione automatica e semi-automatica**, si consiglia, prima di utilizzare il coniugato,

di effettuare uno step di pulizia della fluidica, assicurandosi che le procedure di lavaggio, deproteinizzazione e decontaminazione siano efficaci nell'evitare la contaminazione del coniugato; questa procedura è fortemente raccomandata quando il kit è processato con analizzatori non dotati di puntali monouso.

A tale scopo Diametra rende disponibile separatamente un reattivo decontaminante per il lavaggio degli aghi.

- 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 (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Il sistema di misurazione è calibrato in unità relative arbitrarie. I Calibratori sono pronti all'uso ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	5	10	20	80	320

Una volta aperti i Calibratori sono stabili per 6 mesi a 2÷8°C.

##### 6.2. Preparazione del campione

La matrice di elezione per la determinazione degli anticorpi anti TPO è siero o plasma umano. **Tutti i campioni di siero devono essere prediluiti 1:100 con sample diluent**; per esempio 10 µL di campione possono essere diluiti con 990 µL di sample diluent.

I pazienti non devono necessariamente essere a digiuno e non è richiesta alcuna preparazione particolare.

Raccogliere il sangue mediante prelievo venoso in un vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule per centrifugazione.

I campioni possono essere conservati refrigerati a 2-8 °C per almeno 5 giorni. Per periodi di conservazione più lunghi fino a 6 mesi i campioni dovrebbero essere congelati a -20°C. Per evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti, i campioni dovrebbero essere aliquotati. Non usare campioni microbiologicamente contaminati, così come campioni altamente lipemici o emolizzati.

I Controlli sono pronti all'uso.

### 6.3. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50X) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2-8°C per almeno 30 giorni.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione /Controlli	Bianco
Calibratori C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controlli		100 µL	
Campione diluito		100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 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. <b>Lavaggi automatici:</b> se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubare 30 minuti a temperatura ambiente (22-28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 3 volte con 300 µL di wash solution diluita. <b>Lavaggi:</b> seguire le stesse indicazioni del punto precedente.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti al buio a temperature ambiente (22-28°C).			
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. RISULTATI

### 7.1. Curva di calibrazione

Per l'Anti-TPO il metodo di scelta per il trattamento dei risultati è una elaborazione 4 parametri con assi lin-log per densità ottica e concentrazione rispettivamente. Inoltre si possono utilizzare un'approssimazione spline e coordinate log-log. Tuttavia si raccomanda di utilizzare una curva Lin-Log.

Innanzitutto occorre calcolare la media delle densità ottiche relative ai calibratori. Utilizzare un foglio di carta lin-log e tracciare le densità ottiche medie di ogni calibratore verso la rispettiva concentrazione. Disegnare la curva che approssima nel modo migliore tutti i punti di calibrazione. I punti dei calibratori possono anche essere collegati con segmenti di linea retta. La concentrazione dei campioni incogniti può essere determinata per interpolazione dalla curva di calibrazione.

Risultati tipici (da considerare solo come esempio)

La tabella sotto riportata mostra dei risultati tipici per il test Anti-TPO. I dati sono da considerarsi esemplificativi e non dovrebbero essere utilizzati per il calcolo dei risultati.

CAL	OD1	OD2	mean	C1	C2	mean	CV%
0	0,012	0,013	0,013	0	0,03	0,02	141,42
1	0,125	0,121	0,123	5,65	5,45	5,55	2,49
2	0,212	0,210	0,211	9,94	9,84	9,89	0,71
3	0,395	0,422	0,409	19,37	20,83	20,10	5,12
4	1,303	1,221	1,262	84,12	76,43	80,28	6,77
5	2,521	2,474	2,498	330,2	310,9	320,52	4,26

## 8. VALORI DI RIFERIMENTO

In uno studio sui valori normali eseguito con campioni di siero provenienti da donatori sani sono stati determinati i seguenti intervalli di normalità con il test Anti-TPO:

	Anti TPO [AU/mL]
<b>Normale</b>	< 20
<b>Elevato</b>	20

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.

I risultati positivi dovrebbero essere verificati relativamente allo stato clinico del paziente. Inoltre, ogni decisione relativa alla terapia dovrebbe essere presa individualmente. Si raccomanda che ogni laboratorio stabilisca i suoi propri intervalli normale e patologico di anti TPO serica.

## 9. PARAMETRI CARATTERISTICI

### 9.1. Specificità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 78 sieri (di cui 50 positivi e 28 negativi) hanno mostrato una specificità del 92,9%.

### 9.2. Sensibilità

Test di correlazione contro un analogo kit commerciale di riferimento, effettuati su 78 sieri (di cui 50 positivi e 28 negativi) hanno mostrato una sensibilità del 94,0%.

### 9.3. Limite di Rilevabilità

La minor concentrazione di anti-TPO che può essere distinta dal Calibratore zero è 0,09 AU/mL con limite di confidenza del 95%.

## 10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

---

## BIBLIOGRAFIA

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

Ed. 01/2015

DCM116-6

**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)





DCM116-6  
Ed. 01/2015

# Anti TPO ELISA

for routine analysis

Quantitative determination of antibodies against Thyroperoxidase in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label



$\Sigma = 96$  tests

REF DKO116

## INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Anti-TPO concentration in human serum or plasma.

Anti TPO ELISA kit is intended for laboratory use only.

## 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Anti TPO antibodies (formerly thyroid microsomal antibodies) are directed against a target protein - thyroid peroxidase (TPO) - located in the smooth endoplasmic reticulum of thyroid cells.

Thyroid peroxidase or Thyroperoxidase (TPO) is an enzyme mainly expressed in the thyroid that liberates iodine for addition onto tyrosine residues on thyroglobulin for the production of thyroxine (T4) or triiodothyronine (T3) (thyroid hormones).

It is a frequent epitope of autoantibodies in autoimmune thyroid disease. In autoimmune disorders, your immune system makes antibodies that mistakenly attack normal tissue such as thyroid peroxidase. Antibodies that attack the thyroid gland cause inflammation and impaired function of the thyroid.

The presence of anti-TPO antibodies in serum is associated with thyroid autoimmune diseases (Graves' disease and Hashimoto's thyroiditis). Anti-TPO antibodies mostly belong to the IgG class.

Low to moderate levels of serum anti-TPO antibodies can be found in some other autoimmune pathology (eg systemic lupus erythematosus or Sjogren syndrome) and, rarely, in apparently healthy subjects (especially elderly women). Anti-TPO antibodies are more sensitive in diagnostics of thyroid autoimmune diseases than anti-thyroglobulin (anti-TG) antibodies.

However, in some cases anti-TG positive sera may be negative for anti-TPO. Therefore, combined determination of both types of anti-thyroid antibodies (anti-TPO + anti-TG) provides a more sensitive laboratory diagnostic tool for thyroid autoimmunity.

## 2. PRINCIPLE

This test is based on two-site sandwich enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by the antigen. Antibodies from the specimen bind coated antigen on the microwell surface. Unbound material is removed by washing procedure. Second antibodies directed towards human Ig and labeled with peroxidase enzyme, are then added into the microwells. After subsequent washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogensubstrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is directly related to the quantity of specific antibodies in the specimen.

## 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

### 3.1. Reagent and material supplied in the kit

- Calibrators** (6 vials, 1.2 mL each)  
Phosphate buffer 0.1M,  $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ , human serum  
CAL0 **REF DCE002/11606-0**  
CAL1 **REF DCE002/11607-0**  
CAL2 **REF DCE002/11608-0**  
CAL3 **REF DCE002/11609-0**  
CAL4 **REF DCE002/11610-0**  
CAL5 **REF DCE002/11611-0**
- Controls** (2 vials, 1.2 mL each, ready to use)  
Phosphate buffer 0.1M,  $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ , human serum  
Negative Control **REF DCE045/11601-0**  
Positive Control **REF DCE045/11602-0**
- Sample Diluent** (1 vial, 100 mL)  
Phosphate buffer 0.1M,  $\text{NaN}_3 < 0.1\%$   
**REF DCE053-0**
- Conjugate** (1 vial, 15 mL)  
Anti h-IgG conjugated with peroxidase, BSA 0.1%, Proclin  $< 0.0015\%$   
**REF DCE002/11602-0**
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)  
Microplate coated with antigenic Thyroperoxidase)  
**REF DCE002/11603-0**
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ -TMB (0,26 g/L) (avoid any skin contact)  
**REF DCE004-0**
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)  
Sulphuric acid 0.15M (avoid any skin contact)  
**REF DCE005-0**
- 50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

### 3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

### 3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

### Notes

Store all reagents between 20-8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (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 Calibrators and controls for this product 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 Calibrator and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN<sub>3</sub>) or Proclin 300<sup>R</sup> as preservatives. 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.

#### 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.
- **WARNING: the conjugate reagent is designed to ensure maximum dose sensitivity and may be contaminated by external agents if not used properly;** therefore, it is recommended to use disposable consumables (tips, bottles, trays, etc.). For divided doses, take the exact amount of conjugate needed and do not re-introduce any waste product into the original bottle. In addition, **for doses dispensed with the aid of automatic and semi-automatic devices,** before using the conjugate, it is advisable to clean the fluid handling system, ensuring that the procedures of washing, deproteinization and decontamination are effective in avoiding

contamination of the conjugate; this procedure is highly recommended when the kit is processed using analyzers which are not equipped with disposable tips. For this purpose, Diametra supplies a separate decontamination reagent for cleaning needles.

- 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 should not be used in the assay. Highly lipemic or haemolysed specimens should similarly not be used
- 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>5</sub>)

The assay system is calibrated in relative arbitrary units. The Calibrators have the following concentration:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	5	10	20	80	320

##### 6.2. Preparation of the Sample

For the determination of anti TPO antibodies human serum or plasma is the preferred sample matrix.

**Serum samples have to be prediluted with sample diluent 1:100;** for example 10 µL of sample may be diluted with 990 µL of sample diluent.

The patients need not to be fasting, and no special preparations are necessary. Collect blood by venipuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation.

Samples may be stored refrigerated at 2 - 8°C for at least 5 days. For longer storage of up to six months samples should be stored frozen at -20°C. To avoid repeated thawing and freezing the samples should be aliquoted.

Do not use microbiologically contaminated samples, as highly lipemic or hemolyzed samples.

The Controls are ready to use.

##### 6.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

#### 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>5</sub>), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample or Controls	Blank
Calibrator C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controls		100 µL	
Diluted Sample		100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three 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. <b>Automatic washer:</b> if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 30 minutes at room temperature (22-28°C). Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution. <b>Washing:</b> follow the same indications of the previous point.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes in the dark at room temperature (22-28°C).			
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. RESULTS

### 7.1. Calibration curve

For Anti-TPO a 4-Parameter-Fit with lin-log coordinates for optical density and concentration is the data reduction method of choice. Smoothed-Spline Approximation and log-log coordinates are also suitable. However we recommend using a Lin-Log curve.

First calculate the averaged optical densities for each calibrator well. Use lin-log graph paper and plot the averaged optical density of each calibrator versus the concentration. Draw the best fitting curve approximating the path of all calibrator points. The calibrator points may also be connected with straight line segments. The

concentration of unknowns may then be estimated from the calibration curve by interpolation.

### Typical results (example only)

The figures below show typical results for Anti-TPO. These data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

CAL	OD1	OD2	mean	C1	C2	Mean	CV%
0	0,012	0,013	0,013	0	0,03	0,02	141,42
1	0,125	0,121	0,123	5,65	5,45	5,55	2,49
2	0,212	0,210	0,211	9,94	9,84	9,89	0,71
3	0,395	0,422	0,409	19,37	20,83	20,10	5,12
4	1,303	1,221	1,262	84,12	76,43	80,28	6,77
5	2,521	2,474	2,498	330,2	310,9	320,52	4,26

## 8. REFERENCE VALUES

In a normal range study with serum samples from healthy blood donors the following ranges have been established with the Anti-TPO tests:

	Anti TPO [AU/mL]
Normal	< 20
Elevated	20

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.

Positive results should be verified concerning the entire clinical status of the patient. Also every decision for therapy should be taken individually.

It is recommended that each laboratory establishes its own normal and pathological ranges of serum Anti-TPO.

## 9. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

### 9.1. Specificity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 78 sera (50 of them positive sera and 28 negative sera) shows a 92.9% specificity.

### 9.2. Sensitivity

Comparison test against a commercial reference kit, performed on 78 sera (50 of them positive sera and 28 negative sera) shows a 94.0% sensibility.

### 9.3. Detection limit

The lowest concentration of anti-TPO that can be distinguished from zero Calibrator is 0.09 AU/mL with a confidence limit of 95%.

## 10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

## **BIBLIOGRAPHY**

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

**Ed. 01/2015**

**DCM116-6**

**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)



DCM116-6  
Ed. 01/2015

# Anti TPO ELISA

para análisis de rutina

Determinación cuantitativa de los anticuerpos contra la tiroperoxidasa en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C - 8°C



Σ = 96 ensayos

REF DKO116

## USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de anti TPO en suero o plasma humano.

El kit Anti TPO está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

## 1. SIGNIFICADO CLÍNICO

Los anticuerpos anti TPO (también denominados anticuerpos microsomales de la tiroides) son directos contra la peroxidasa de la tiroides (TPO) situada en el retículo endoplásmico liso de las células de la tiroides.

La peroxidasa de la tiroides o tiroperoxidasa (TPO) es una enzima que se expresa principalmente en la tiroides, que permite la adición de yodo en los residuos tirosínicos de la tiroglobulina para la síntesis de la tiroxina (T4) o de la triyodotironina (T3) (hormonas tiroideas).

En las enfermedades autoinmunitarias, el sistema inmunitario libera los anticuerpos que atacan por error al organismo como, por ejemplo, la peroxidasa de la tiroides. Los anticuerpos que atacan a la glándula tiroidea causan inflamación y disfunción de la tiroides.

La presencia de los anticuerpos de anti TPO en el suero se asocia a las enfermedades autoinmunes de la tiroides (enfermedad de Graves y de Hashimoto). Los anticuerpos anti TPO son de clase IgG.

Se pueden encontrar niveles bajos de los anticuerpos anti TPO en suero en las patologías autoinmunes (por ejemplo, lupus o síndrome de Sjögren) y, raramente, en individuos aparentemente sanos (en particular, en mujeres ancianas). El ensayo de los anticuerpos de anti TPO es un método de diagnóstico sensible de las enfermedades autoinmunitarias de la tiroides en lugar de los anticuerpos anti-tiroglobulina (anti-TG). Sin embargo, en algunos casos, los sueros positivos anti-TG pueden ser negativos para anti-TPO. Como consecuencia, la determinación de ambos tipos de anticuerpos antitiroideos (anti TPO + anti-TG) proporciona un diagnóstico de laboratorio más sensible para la autoinmunidad de la tiroides.

## 2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo se basa en el principio inmunoenzimático del sándwich. La muestra que se va a comprobar se incuba en la microplaca recubierta con el antígeno.

Los anticuerpos contenidos en la muestra se unen a los antígenos presentes en la superficie de la microplaca. El material no unido se retira mediante un procedimiento de lavado.

Un segundo anticuerpo anti-IgG humana conjugado con peroxidasa se deja incubar en los pocillos.

Tras el lavado posterior, se determina y se cuantifica la actividad enzimática remanente unida a la superficie de los pocillos mediante la adición del sustrato cromógeno y de la solución de parada, y mediante la lectura a 450 nm. La

densidad óptica en los pocillos es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos específicos presentes en la muestra.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

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

- Calibradores** (6 frascos, 1,2 mL cada uno)  
Tampón fosfato 0,1 M, NaN<sub>3</sub> < 0,1%, suero humano  
CAL0 REF DCE002/11606-0  
CAL1 REF DCE002/11607-0  
CAL2 REF DCE002/11608-0  
CAL3 REF DCE002/11609-0  
CAL4 REF DCE002/11610-0  
CAL5 REF DCE002/11611-0
- Controles** (2 frascos, 1,2 mL cada uno, listo para usar)  
Tampón fosfato 0,1 M, NaN<sub>3</sub> < 0,1%, suero humano  
Control negativo REF DCE045/11601-0  
Control positivo REF DCE045/11602-0
- Diluyente de muestra** (1 frasco, 100 mL)  
Tampón fosfato 0,1 M, NaN<sub>3</sub> < 0,1%  
REF DCE053-0
- Conjugado** (1 frasco, 15 mL)  
Anti h-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP), BSA 0,1%, Proclin < 0,0015% REF DCE002/11602-0
- Microplaca recubierta** (1 microplaca rompible)  
Microplaca rompible con tiroperoxidasa antigénica absorbida  
REF DCE002/11603-0
- Substrato TMB** (1 frasco, 15 mL)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE004-0
- Solución de parada** (1 frasco, 15 mL)  
Ácido sulfúrico 0,15M (evitar el contacto con la piel)  
REF DCE005-0
- Solución de lavado conc. 50X** (1 frasco, 20 mL)  
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L REF DCE006-0

### 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)

## Notas

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

Llevar a temperatura ambiente la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) antes de abrirla; cerrarla de

inmediato después de sacar las tiras que se han de utilizar; una vez abierto, se mantiene estable hasta la fecha de caducidad indicada en el 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 Calibradores y de los Controles 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 Calibradores y los controles positivo y negativo deben manipularse como material potencialmente infeccioso.
- Materiales de origen animal utilizadas para la elaboración de este kit se obtuvieron a partir de animales sanos y de las proteínas de bovino se obtuvieron de los países no afectados por la EEB, pero estos materiales se debe utilizar como potencialmente infecciosos.
- 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, usada como conservante, 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 parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.

#### 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.
- **ATENCIÓN: se ha estudiado el reactivo conjugado para garantizar la máxima sensibilidad en la determinación y, por lo tanto, si no se usa**

#### **adecuadamente, podría contaminarse por agentes**

**externos**; se recomienda utilizar consumibles (puntas, frascos, bandejas, etc.) desechables. Para determinaciones fraccionadas, tomar la cantidad necesaria exacta de conjugado y evitar volver a introducir los posibles restos en el frasco original. Además, **para determinaciones realizadas con la ayuda de instrumentación automática y semiautomática**, se recomienda, antes de usar el conjugado, realizar una fase de limpieza de la flúidica, asegurándose de que los procedimientos de lavado, desproteínización y descontaminación resulten eficaces para evitar la contaminación del conjugado; **este procedimiento se recomienda especialmente cuando el kit se procesa con analizadores que no están dotados de puntas monouso**. Para tal fin, Diametra pone a su disposición por separado un reactivo descontaminante para el lavado de las agujas.

- 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 parada. Tanto el sustrato como la solución de parada 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>5</sub>)

El sistema de medición está calibrado en unidades relativas arbitrarias. Los Calibradores están listos para usarse y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
AU/mL	0	5	10	20	80	320

Una vez abiertos, los Calibradores permanecen estables 6 meses conservados a 2-8°C.

##### 6.2. Preparación de la muestra

Las matrices de elección para la determinación de los anticuerpos anti TPO son suero o plasma humano. **Todas las muestras de suero deben prediluirse 1:100 con diluyente de muestras**; por ejemplo, 10 µL de muestra pueden diluirse con 990 µL de diluyente de muestras. Los pacientes no deben necesariamente estar en ayunas y no se requiere ninguna preparación especial.

Recoger la sangre mediante extracción venosa en un Vacutainer y separar el suero (tras la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugado. Las muestras pueden conservarse refrigeradas a 2-8°C durante al menos 5 días. Para períodos de conservación más largos, hasta 6 meses, las muestras deberán congelarse a -20°C. Para evitar congelaciones y descongelaciones repetidas, las muestras deberían dividirse en alícuotas. No usar muestras contaminadas microbiológicamente, ni muestras muy lipémicas o hemolizadas. Los controles son listo para usar.

### 6.3. Preparación de la solución de lavado

Antes del uso, diluir el contenido de cada ampolla de solución de lavado tamponada concentrada (50x) con agua destilada hasta un volumen de 1000 mL. Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8 °C durante al menos 30 días.

### 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 (C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	100 µL		
Controles		100 µL	
Muestra diluida		100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. <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. <b>Lavados automático:</b> si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.			
Conjugado	100 µL	100 µL	
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22-28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida. <b>Lavados:</b> siga las mismas instrucciones del punto anterior.			

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (22-28 °C).			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
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.			

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Curva de calibración

Para anti-TPO, el método de elección para el tratamiento de los resultados es un procesamiento de 4 parámetros con ejes lin-log para la densidad óptica y la concentración respectivamente. Además, se pueden usar una aproximación spline y coordenadas log-log. Sin embargo, se recomienda usar una curva Lin-Log.

En primer lugar, calcular la media de las densidades ópticas relativas a los calibradores. Usar una hoja de papel lin-log y trazar las densidades ópticas medias de cada calibrador frente a la respectiva concentración. Dibujar la curva que mejor se aproxime a todos los puntos de calibración. Los puntos de los calibradores también pueden unirse con segmentos de línea recta. La concentración de las muestras desconocidas puede determinarse por interpolación de la curva de calibración.

Resultados típicos (se deben considerar solo como ejemplo)

La tabla que aparece a continuación muestra los resultados típicos para el ensayo Anti TPO. Los datos deben considerarse como ejemplo y no deben usarse para el cálculo de los resultados.

CAL	DO1	DO2	media	C1	C2	media	CV%
0	0,012	0,013	0,013	0	0,03	0,02	141,42
1	0,125	0,121	0,123	5,65	5,45	5,55	2,49
2	0,212	0,210	0,211	9,94	9,84	9,89	0,71
3	0,395	0,422	0,409	19,37	20,83	20,10	5,12
4	1,303	1,221	1,262	84,12	76,43	80,28	6,77
5	2,521	2,474	2,498	330,2	310,9	320,52	4,26

## 8. VALORES DE REFERENCIA

En un estudio sobre los valores normales realizado con muestras de suero procedentes de donantes sanos se han determinado los siguientes intervalos de normalidad con el ensayo Anti TPO:

Anti TPO (AU/mL)	
Normal	< 20
Alto	20

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.

Los resultados positivos deben verificarse con relación al estado clínico del paciente. Además, cada decisión relativa a la terapia debe tomarse individualmente. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos normal y patológico de anti TPO sérica.

## **9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO**

### **9.1. Especificidad**

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 78 sueros (50 positivos y 28 negativos) han mostrado una especificidad del 92,9%.

### **9.2. Sensibilidad**

Ensayos de correlación frente a un kit similar de referencia disponible en el mercado, realizados con 78 sueros (50 positivos y 28 negativos) han mostrado una sensibilidad del 94,0%.

### **9.3. Límite de detección**

La concentración mínima de anti TPO que puede distinguirse del Calibrador cero es 0,09 AU/mL con un límite de confianza del 95%.

## **10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN**

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

---

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Volpè R., CRC Press , (1990)
- Volpè R., Clin. Chem. 40 2132 (1994)
- Beever K., Clin. Chem. 35 1949-54 (1989)
- Mat Clin. Chem. 40 2128 (1994)
- Chiavato L., Autoimmunity 10, 319-31 (1991)
- Degroot LJ, Thyroperoxidase Thyroid Autoimmunity 207:177 – 182 (1990)

**Ed. 01/2015**

**DCM116-6**

**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)



	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



DCM137-2  
Ed. 01/2015

## Total PSA

per analisi di routine

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della PSA (Prostata Specific Antigen) totale in siero e plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO137

### DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Total PSA ELISA è utilizzato per la determinazione quantitativa dell'antigene prostatico specifico totale (tPSA) in siero o plasma umano. La misura dei livelli di PSA totale è utilizzata per stimare il rischio di carcinoma della prostata negli uomini, in combinazione con l'esplorazione rettale digitale (DRE), o per monitorare l'efficacia del trattamento nei pazienti con carcinoma della prostata.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il cancro alla prostata è il tipo più frequente di tumore scoperto nell'uomo ed è la seconda causa di morte per tumore nei maschi. Fino a poco tempo fa, l'esplorazione rettale digitale (DRE) è stata spesso utilizzata come unica modalità di diagnosi per l'individuazione del tumore alla prostata nelle fasi iniziali. Negli ultimi anni la determinazione dei livelli sierici di PSA è diventato il metodo più accettato per migliorare la specificità diagnostica del DRE. Anche se è una proteina tessuto-specifica e non è solo tumore-specifica, la PSA è diventata il marcatore più importante per il carcinoma alla prostata, mostrando una specificità migliore di altri marcatori biochimici utilizzati in questo contesto (PAP, fosfatasi alcalina totale, l'antigene carcinoembrionario, ecc).

Nel 1979, Wang et al isolarono un antigene specifico per il tessuto prostatico normale e chiamarono questa proteina PSA. Come dimostrato da studi immunostologici, la PSA è localizzata nel citoplasma delle cellule acinose della prostata, dell'epitelio duttale e nella secrezione del lumina duttale, presente nei tessuti della prostata normali, benigni iperplastici e maligni, così come nel cancro metastatico della prostata e nel liquido seminale. Se l'integrità strutturale della prostata è alterata e/o le dimensioni della ghiandola aumentano, la quantità di PSA nel plasma sanguigno può diventare elevata. Un aumento dei livelli di PSA a valori superiori di 3-4 ng/mL è stato riportato per i pazienti con ipertrofia prostatica benigna (BPH) o con carcinoma alla prostata. A questa soglia, sono consigliati esami di follow-up che permettono di distinguere tra queste due condizioni.

La determinazione dei livelli sierici di PSA non è importante solo per lo screening dei pazienti con cancro alla prostata, ma anche per monitorare i pazienti che sono stati trattati per questa patologia. In questo caso, le regolari misurazioni di PSA sono un importante strumento per esaminare l'efficacia potenziale e reale della chirurgia o di altre terapie. Un aumento di PSA nei pazienti dopo prostatectomia radicale o radioterapia possono consentire un precoce rilevamento di carcinoma residuo o ricorrente

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Questo kit è un saggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA), basato sul principio del sandwich.

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con un anticorpo diretto verso un epitopo della PSA antigenica. Un'aliquota di siero del paziente viene incubato nei pozzetti coattati insieme ad un secondo anticorpo coniugato ad un enzima (E-Ab), diretto verso un'altra regione della molecola di antigene. Dopo incubazione, la frazione E-Ab non legata è lavata via. La quantità di E-Ab legato è proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione. Dopo aver aggiunto la soluzione di substrato, l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione. Le densità ottiche dei calibratori misurate sono utilizzate per costruire una curva di calibrazione contro la quale vengono calcolate le concentrazioni sconosciute dei campioni.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. PSA Calibrators (6 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

CAL0 / Sample Diluent (10 mL) REF DCE002/13706-0

CAL1 REF DCE002/13707-0

CAL2 REF DCE002/13708-0

CAL3 REF DCE002/13709-0

CAL4 REF DCE002/13710-0

CAL5 REF DCE002/13711-0

Contengono un preservante privo di mercurio.

2. Controlli (2 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un preservante privo di mercurio.

Low Control REF DCE045/13701-0

High Control REF DCE045/13702-0

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo monoclonale anti PSA assorbito sulla micropiastra

REF DCE002/13703-0

4. Enzyme Conjugate (1 flacone, 12 mL)

Anticorpo anti PSA coniugato a perossidasi di rafano (HRP). Contiene un preservante privo di mercurio.

REF DCE002/13702-0

5. Substrate Solution (1 flacone, 12 mL)

Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

REF DCE004/13704-0

6. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)

Contiene acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (evitare il contatto, può causare irritazioni e bruciateure)

REF DCE005/13705-0

### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

- Acqua distillata.
- Micropipette di precisione (volume: 25 µL e 100 µL) con puntali monouso.
- Fotometro ELISA con filtri a 450 nm e 630 nm.
- Timer con range a 60 minuti o superiore.
- Lavatore di micropiastre (opzionale).
- Vortex o strumenti di miscelazione similari.
- Contenitore per la corretta gestione dei rifiuti e dei campioni dopo l'uso.

### 4. CONSERVAZIONE E STABILITA'

- Conservare il kit e i componenti a 2-8°C
- Portare a temperatura ambiente (18-25°C) almeno 30 minuti prima dell'uso. Dopo l'uso rimettere in frigorifero. Evitare la conservazione a temperatura ambiente per molto tempo.
- Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza. Per la data di scadenza del kit originale imballato vedere l'etichetta del kit.
- Chiudere le bottiglie subito dopo l'uso.
- Conservare la piastra incluso l'essiccante nell'apposita busta con zip-lock. Le strip non utilizzate devono essere sempre conservate in questa condizione.
- Assicurarsi che i componenti del kit non congelino.

### 5. PRECAUZIONI

- I kit ELISA sono solo per uso diagnostico in vitro da parte di professionisti.
- I campioni di siero e plasma devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti ed indumenti da laboratorio quando si maneggiano i campioni. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono gestiti i campioni o i reagenti del kit. Non pipettare con la bocca. In caso di contatto con la pelle, lavare con un sapone germicida e acqua abbondante. Consultare un medico se indicato.
- Gli Standard di PSA ed i controlli sono di origine umana. Essi sono stati testati e confermati negativi per HIV, HBsAg e HCV. Tuttavia, tutti i Calibratori dovrebbero essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
- Dato il carattere potenzialmente infettivo dei campioni e dei componenti del kit, tutti i materiali che sono venuti a contatto con queste componenti dovrebbero essere sterilizzati e smaltiti secondo le normative locali. Questo include anche i rifiuti liquidi.
- I reagenti del kit contengono conservanti, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o acido solforico e possono essere dannosi se ingeriti. Il contatto diretto con la pelle o la mucosa dovrebbe essere evitato. In caso di contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico se necessario.
- La Stop Solution contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Poiché l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizzata per bloccare la reazione del colore è corrosiva, la strumentazione utilizzata per la dispensazione deve essere accuratamente pulita dopo l'uso.
- Non scambiare i reagenti di lotti o fornitori diversi.
- Evitare la contaminazione di reagenti o campioni usando puntali usa e getta.
- Non utilizzare il kit se la confezione della micropiastra o le bottiglie sono state danneggiate.

## 6. GUIDA PER LA RACCOLTA, LA PREPARAZIONE E LA CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

### 6.1. Raccolta del campione

I campioni di sangue vengono raccolti per venipuntura. Poiché diversi fattori possono influenzare il livello di PSA nel sangue, i medici devono assicurarsi che il paziente abbia evitato le seguenti condizioni prima di prendere il campione di sangue.

Le seguenti condizioni possono portare ad un aumento dei livelli di PSA:

- bicicletta
- rapporto sessuale (eiaculazione)
- manipolazione della prostata durante le visite mediche come DRE, ecografia prostatica transrettale, ecc
- prostatite
- disfunzione epatica

Le seguenti condizioni possono portare ad una diminuzione dei livelli di PSA:

- assunzione di inibitori per la 5-alfa-reduttasi, antiandrogeni, o GnRH- analoghi

### 6.2. Preparazione del campione

La preparazione dei campioni di siero o plasma viene eseguita secondo le tecniche standard. Siero o plasma deve essere preparati al più presto per evitare l'emolisi e migliorare la stabilità della PSA.

### 6.3. Conservazione dei campioni

Per il dosaggio possono essere utilizzati siero o plasma freschi.

Se non si utilizzano immediatamente, i campioni possono essere conservati a 2-8°C per 1 settimana. In caso di conservazione prolungata, congelare a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni.

#### Nota

- I campioni fortemente lipemici o emolitici possono dare risultati analitici errati.
- I campioni devono essere esenti da contaminazioni microbiche.
- I campioni contenenti alti titoli di fattore reumatoide ed anticorpi umani anti-topo (HAMA) potrebbero fornire risultati errati.

## 7. PROCEURA DEL SAGGIO

### 7.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono calibrati contro il WHO 96/670 ed hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	1,56	3,12	6,25	12,50	25,00

Contengono un conservante.

### 7.2. Procedura

Nota: si consiglia di effettuare tutte le misurazioni in duplicato. Per ogni serie di misurazioni dovrebbe essere eseguita una curva di calibrazione indipendente. Per ottenere i migliori risultati, è importante che le soluzioni siano sempre aggiunte ai pozzetti nello stesso ordine, al fine di minimizzare le variazioni nei tempi di incubazione.

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, i Calibratori, i controlli e i campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificare che tutti i componenti non siano scaduti e verificare che le bottiglie e la piastra (busta compresa) non siano danneggiati.

- Prelevare le strip necessarie, tenendo presente che tutte le misurazioni devono essere effettuate in duplicato. Documentare la posizione dei pozzetti e dei rispettivi campioni, Calibratori e controlli per garantire l'identificazione dopo il saggio. Riporre tutte le strip inutilizzate nella busta con la zip-lock insieme al sacchetto essiccante, sigillare e conservare a 2-8°C.
- I campioni con un valore previsto di PSA superiori a 25 ng/mL devono essere diluiti con il sample diluent.

Reagenti	Calibratore	Campione	Controlli
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Controlli			25 µL
Campione		25 µL	
Incubare 5 minuti a temperatura ambiente (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Miscelare bene muovendo la piastra sul tavolo (10 sec).            Incubare 1 h a temperatura ambiente (18-25°C).            Rimuovere la soluzione dai pozzetti per aspirazione o decantazione; per la decantazione, battere leggermente la piastra su carta assorbente per rimuovere il liquido residuo.            Per il lavaggio riempire i pozzetti con acqua distillata e aspettare 15 secondi prima di rimuovere l'acqua; lavare 5 o 6 volte.  <u>Procedura raccomandata:</u> lavare i pozzetti 6 volte con 250 µL di acqua distillata per pozzetto. Preferibilmente utilizzare una procedura di lavaggio automatizzata. Se si lava manualmente, fare attenzione che la soluzione di lavaggio rimanga in ogni pozzetto lo stesso tempo. Questo è necessario per ottenere valori di CV il più bassi possibile.</p>			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 20 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) al buio.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitare delicatamente la micropiastra.            Leggere l'assorbanza (OD) a 450 nm (azzerando a 630nm)</p>			

## 8. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media dei valori di assorbanza per ogni set di Calibratori, controlli e campioni dei pazienti.
2. Usando carta millimetrata, costruire una curva di calibrazione riportando l'assorbanza media ottenuta da ogni Calibratore contro la sua concentrazione, con il valore di assorbanza sull'asse verticale (Y) e la concentrazione sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio di assorbanza per ciascun campione, determinare la concentrazione corrispondente dalla curva di calibrazione.
4. Metodo automatico: i risultati nella IFU sono stati calcolati automaticamente utilizzando una curva 4 PL (4 parametri logistici). Il metodo 4 parametri logistici è il più idoneo. Altre funzioni di analisi dei dati possono dare risultati leggermente diversi.
5. La concentrazione dei campioni possono essere lette direttamente da questa curva di calibrazione. I campioni con concentrazione superiore a quella del calibratore più alto devono essere diluiti o refertati come > 25 ng/mL. Per il calcolo della concentrazione

deve essere preso in considerazione anche il fattore di diluizione.

## 8.1. Esempio di una tipica curva di calibrazione

I dati seguenti sono solo illustrativi e non devono essere utilizzati durante i dosaggi.

Calibratori	Densità ottiche (450 nm)
Calibratore 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibratore 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibratore 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibratore 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibratore 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibratore 5 (25,0 ng/mL)	2.01

## 9. CONTROLLO QUALITA'

- Si raccomanda che i controlli interni vengano utilizzati in duplicato in ogni analisi. I risultati dei controlli devono essere entro i limiti stabiliti e preferibilmente dovrebbero rappresentare livelli di concentrazione bassi, medi ed alti.
- Il rischio per il paziente è dovuto principalmente a risultati falsamente negativi intorno al valore di cut-off di PSA < 4,0 ng/mL. È quindi altamente consigliato convalidare il kit e il laboratorio attraverso processi esterni (ad es DGKC).

## 10. VALORI ATTESI E LIMITAZIONI DEL TEST

La soglia generalmente raccomandata per gli esami di follow-up è la seguente:

Valore di cut-off: 3,0-4,0 ng PSA / mL

Uomini in buona salute hanno in genere una concentrazione di PSA inferiore a 4,0 ng/mL. Se la concentrazione di PSA è pari o superiore a 4,0 ng/mL sono altamente raccomandati esami di follow-up. Questa concentrazione di PSA indica un rischio elevato di cancro alla prostata, ma potrebbe anche essere causato da BPH. Si prega di notare che la soglia di 4 ng/mL è solo un valore indicativo. In letteratura è riportato che le modifiche dovute a età e background etnologico potrebbero essere utili: ad esempio per uomini più giovani il limite dovrebbe essere inferiore a quello degli uomini anziani. Se possibile, è consigliabile per ogni laboratorio di stabilire i propri valori specifici che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio.

È importante tenere a mente che alcuni tumori della prostata non causano elevati livelli di PSA, pertanto le misurazioni di PSA non dovrebbero mai sostituire il DRE, ma devono essere usate solo in combinazione con il DRE.

Poiché elevati livelli di PSA potrebbero anche essere causati da condizioni non cancerose, seguire gli esami potrebbero aumentare la specificità diagnostica dei valori di t-PSA. In letteratura vengono indagate la densità della PSA, la velocità della PSA e la percentuale di f-PSA per t-PSA per migliorare la discriminazione tra le condizioni cancerose e non-cancerose, e ciò potrebbe essere utilizzato per ridurre biopsie prostatiche non necessarie. Ma solo una biopsia prostatica può chiaramente mostrare se un carcinoma della prostata è presente o meno.

**Nota: i valori di PSA possono essere utilizzati solo per stimare il rischio di cancro. Essi devono sempre essere interpretati in combinazione con altri risultati**

clinici e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi del carcinoma prostatico.

## 11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

### 11.1. Limite di deteazione

Il limite di deteazione per questo kit è 0.2 ng/mL.

### 11.2. Precisione

La precisione intra- ed inter-assay è stata stabilita analizzando tre sieri di pazienti con diverse concentrazioni di PSA. I risultati sono mostrati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1. *Intra-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Tabella 2. *Inter-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

### 11.3. Recupero

Una quantità nota di PSA è stata aggiunta a tre sieri di pazienti ed è stata poi misurata la quantità recuperata. I risultati sono mostrati nella Tabella 3.

Tabella 3. *Recupero*

Campione	Valore atteso (ng/mL)	Valore osservato (ng/mL)	Recupero %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

### 11.4. Specificità

Gli anticorpi utilizzati in questo kit sono altamente specifici per la PSA totale (PSA libera e PSA-ACT-complesso), con una reattività crociata relativamente bassa per altre proteine e polipeptidi, lipidi o agenti chemioterapici che potrebbero essere presenti nei campioni dei pazienti

Tabella 4. *Specificità*

Antigeni	Quantità aggiunta	Cross-reazione
<b>Proteine</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lattoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Sostanze interferenti</b>		
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Emoglobina*	0.1 mg/ml	No
Trigliceridi	15 mg/mL	No
<b>Agenti chemioterapici</b>		
Ciclofosfamide	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

\* a più alta concentrazione l'emoglobina dà valori di OD troppo elevati, pertanto i campioni emolitici dovrebbero essere evitati.

### 11.5. Effetto Hook

Il dosaggio è stato testato per verificare l'effetto gancio. Fino ad una concentrazione di PSA di 2000 ng/mL non è stato osservato nessun effetto gancio. Si prega di notare che se l'OD è fuori della gamma standard per i campioni ad alta concentrazione, per ottenere risultati corretti il campione deve essere diluito prima della misura successiva.

### 11.6. Correlazione

Il kit Diametra Total PSA ELISA è stato comparato con il kit Roche ElecSys Total PSA:

$$Y = 0.9644 * X + 0.0741$$

In un secondo studio il kit Diametra Total PSA ELISA è stato comparato con un altro kit ELISA per la PSA marcato CE:

$$Y = 1.001 * X, R^2 = 0.9704$$

## 12. ASPETTI GIURIDICI

### 12.1. Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo le istruzioni del produttore per l'uso. Inoltre l'utente deve rigorosamente rispettare le regole GLP (Good Laboratory Practice) o di altre norme nazionali e/o leggi vigenti.

Questo è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. All'interno della procedura di prova, è importante includere sempre un numero sufficiente di controlli per validare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono all'interno del range specificato e se tutti gli altri parametri di prova sono anche all'interno delle specifiche del saggio. In caso di qualsiasi dubbio o preoccupazione contattare Diametra.

## 12.2. Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai essere basate solamente sui risultati di laboratorio, neanche se tutti i risultati sono in accordo con quanto indicato al punto 12.1. Ogni risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accettabile accordo con il quadro clinico complessivo del paziente devono essere decise conseguenze terapeutiche. Il risultato del test stesso non dovrebbe mai essere l'unico fattore determinante per decidere trattamenti terapeutici.

## 12.3. Responsabilità

Qualsiasi modifica del kit di prova e/o lo scambio o miscelazione di componenti di lotti diversi da un kit ad un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati attesi e la validità della prova generale. Tali modifiche e/o scambi annullano qualsiasi tipo di richiesta di sostituzione.

I reclami presentati a causa di un'errata interpretazione dei risultati di laboratorio da parte dei clienti e soggetti al punto 12.2 sono anch'essi non validi. Indipendentemente da ciò, in caso di qualsiasi reclamo, la responsabilità del produttore non supera il valore del kit. Eventuali danni arrecati al kit per il test durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

## 13. BIBLIOGRAFIA

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/ll/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

Ed. 01/2015

DCM137-2

**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 SPELLLO (PG) Italy  
Tel. +39-0742-24851  
Fax +39-0742-316197  
E-mail: [info@diametra.com](mailto:info@diametra.com)





DCM137-2  
Ed. 01/2015

## Total PSA

for routine analysis

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of total PSA (Prostate Specific Antigen) in human serum and plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO137

### INTENDED USE

DiaMetra Total PSA ELISA is used for the quantitative determination of total Prostate Specific Antigen (t-PSA) in human serum or plasma samples. The determination of total PSA levels is used to estimate the risk of prostate carcinoma in men in conjunction with digital rectal examination (DRE) or to monitor the effectiveness of prostate carcinoma treatment in patients.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prostate cancer is the most frequent type of cancer found in man and is the second cause of death due to cancer in males. Until recently, digital rectal examination (DRE) was frequently used as only diagnostic modality for the detection of early stages of prostate cancer. In the recent years the determination of serum PSA levels has become the most accepted method to improve the diagnostic specificity of DRE. Although PSA is a tissue specific protein and is not solely tumor specific, it has become the most important marker for prostate carcinoma, showing a better specificity than other biochemical markers used in this context (PAP, total alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, etc.).

In 1979, Wang et al isolated a specific antigen for normal prostate tissue and called this protein PSA. As demonstrated by immunohistological studies, PSA is localized in the cytoplasm of prostate acinar cells, ductal epithelium and in the secretion on the ductal lumina, present in normal, benign hyperplastic and malignant prostate tissues as well metastatic prostate cancer and in seminal plasma. If the structural integrity of the prostate is disturbed and/or the gland size is increased, the amount of PSA in the blood plasma may become elevated. An elevation of PSA levels to values higher than 3-4 ng/ml has been reported for patients with either benign prostatic hypertrophy (BPH) or prostate carcinoma. At this threshold follow-up examinations that allow to differentiate between these two conditions are recommended.

The determination of PSA serum levels is not only important for the screening of patients for prostate cancer, but also for monitoring patients that have been treated for this disease. Here regular PSA measurements are an important tool to examine the potential and actual effectiveness of surgery or other therapies. An increase of PSA in patients after radical prostatectomy or radiotherapy may allow an earlier discovery of residual or recurrent carcinoma.

### 2. PRINCIPLE OF THE METHOD

This assay is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the sandwich principle.

The microtiter wells are coated with an antibody, directed towards an epitope of an antigenic PSA. An aliquot of patient serum is incubated in the coated well with enzyme conjugated second antibody (E-Ab), directed towards a different region of the antigen molecule. After incubation the unbound E-Ab is washed off. The amount of bound E-Ab is proportional to the concentration of antigen in the sample. After adding the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the antigen concentration in the sample. The measured ODs of the Calibrators are used to construct a calibration curve against which the unknown samples are calculated.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

##### 1. PSA Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)

CAL0 / Sample Diluent (10 mL) REF DCE002/13706-0  
CAL1 REF DCE002/13707-0  
CAL2 REF DCE002/13708-0  
CAL3 REF DCE002/13709-0  
CAL4 REF DCE002/13710-0  
CAL5 REF DCE002/13711-0

Contain non-mercury preservative.

##### 2. Controls (2 vials, 0.5 mL each)

For concentration see the Certificate of Analysis.

Contains non-mercury preservative.

Low Control REF DCE045/13701-0  
High Control REF DCE045/13702-0

##### 3. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Monoclonal antibody anti PSA adsorbed on microplate

REF DCE002/13703-0

##### 4. Enzyme Conjugate (1 vial, 12 mL)

Monoclonal antibody anti PSA conjugated to horseradish peroxidase. Contains non-mercury preservative.

REF DCE002/13702-0

##### 5. Substrate Solution (1 vial, 12 mL)

Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

REF DCE004/13704-0

##### 6. Stop Solution (1 vial, 14 mL)

Contains sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (avoid contact with the Stop Solution, it may cause skin irritations and burns)

REF DCE005/13705-0

### 3.2. Material required but not provided

- Distilled water.
- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips.
- ELISA photometer with 450 nm and 630 nm filters.
- Timer with 60 min. range or higher.
- Microplate washer (optional).
- Vortex or similar mixing tools.
- Container for the proper handling of waste and samples after use.

### 4. STORAGE AND STABILITY

- Store the kit and components at +2 to + 8°C
- Bring to room temperature (18-25°C) at least 30 minutes before use. After use put back into the refrigerator. Avoid long time storage at room temperature.
- Do not use the kit or components after the expiry date. For expiry date of the original packed kit see kit label.
- Close the bottles immediately after use.
- Store the plate incl. desiccant in the provided zip-lock pouch. Modules that are not used should always be stored under this condition.
- Ensure that kit components do not freeze.

### 5. PRECAUTIONS

- ELISA kits are only for in vitro diagnostic use by professionals.
- Serum and plasma samples should be treated as potentially infectious materials. Wear gloves and proper laboratory attire when handling sample materials. Do not eat, drink or smoke in areas where specimen or kit reagents are handled. Do not pipette with the mouth. In case of skin contact, wash with a germicidal soap and copious amounts of water. Seek medical advice if indicated.
- The PSA Calibrators and controls are of human origin. They have been tested and confirmed negative for HIV, HBsAg and HCV. However, all Calibrators should be treated as potential biohazards.
- Due to the potentially infectious character of samples and kit components all materials that have come in contact with these materials should be sterilized and disposed of according to local regulations. This also includes the liquid waste.
- The assay reagents contain preservatives, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or sulphuric acid and may be harmful if ingested. A direct skin or mucosa contact should be avoided. In case of skin contact, wash thoroughly with water and seek medical attention if required.
- The stop solution contains H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Since the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> used to terminate the color reaction is corrosive, the instrumentation employed to dispense it should be thoroughly cleaned after use.
- Do not interchange reagents from different lots or different suppliers.
- Avoid reagent or sample carry-over by using fresh tips for solutions and samples.
- Do not use test kit if zip lock pouch or bottles have been damaged.

## 6. GUIDELINE FOR SAMPLE COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

### 6.1. Sample collection

Blood samples are collected by venipuncture. As different factors could influence the PSA level in blood, doctors should ensure that the patient has avoided the following conditions before taking the blood sample.

The following conditions may lead to an increase of PSA levels:

- biking
- sexual intercourse (ejaculation)
- Manipulation of the prostate during medical examinations like DRE, transrectal prostatic ultrasound etc.
- Prostatitis
- Liver dysfunction

The following conditions may lead to a decrease of PSA levels:

- Intake of 5-alpha-reductaseinhibitors, antiandrogens, or GnRH analoga

### 6.2. Sample preparation

The preparation of serum or plasma samples is performed according to standard techniques. Serum or plasma should be prepared as soon as possible to avoid hemolysis and to improve the stability of PSA.

### 6.3. Storage of samples

For the assay either fresh serum or plasma samples can be used.

If not used immediately they can be stored at 2-8°C for 1 week. In case of longer storage, freeze at -20°C. A repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

#### Note

- Highly lipemic or hemolytic samples can give incorrect analytical results.
- Samples must be free of microbial contaminations.
- Samples containing high titers of rheumatoid factor and human anti-mouse antibodies (HAMA) could give erroneous results.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### 7.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are calibrated against the WHO 96/670 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	1.56	3.12	6.25	12.50	25.00

Contain a preservative.

### 7.2. Procedure

Note: It is highly recommended to perform all measurements as duplicates. An independent calibration curve should be made for each series of measurements. For best results it is important that the solutions are always added to the wells in the same order to minimize variations in incubation times.

- Prior to use bring all reagents, Calibrators, controls, and samples to room temperature (18-25°C).
- Check that all components are not expired and take care that bottles and plate (inclusive pouch) are not damaged.
- Format the required microplate wells. Keep in mind that all measurements should per performed as duplicate. Document position of wells and respective samples, Calibrators and controls to ensure later identification.

Put any unused microwell modules back into the zip lock bag with the desiccant, seal bag and store at 2-8 °C.

- Samples with an expected PSA value higher than 25 ng/mL should be diluted with the sample diluent.

Reagent	Calibrator	Sample	Control
Calibrator C0-C5	25 µL		
Control			25 µL
Sample		25 µL	
Incubate 5 minutes at room temperature (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	100 µL	100 µL	100 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec) Incubate 1 hour at room temperature (18-25°C). Remove solution from the wells by aspirating the liquid or by decanting it. If decanting, tap plate on adsorbent paper to remove residual liquid. For washing fill plate with distilled water and wait 15 sec before removing the distilled water; wash 5x to 6x. <u>We recommend the following procedure:</u> wash wells 6-times with 250 µL / well distilled water. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually take care that the washing solution remains in each well for the same time. This is necessary to receive lowest possible CV-values.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 20 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read absorbencies (OD) at 450 nm (blanking 630 nm)			

## 8. CALCULATION OF RESULTS

1. Calculate the average absorbance values for each set of Calibrators, controls and patient samples.
2. Using linear graph paper, construct a calibration curve by plotting the mean absorbance obtained from each Calibrator against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the IFU have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this calibration curve. Samples with concentrations higher than that of the highest Calibrator have to be further diluted or reported as > 25 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

### 8.1. Example of Typical Calibration Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Calibrator	Optical Units (450 nm)
Calibrator 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibrator 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibrator 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibrator 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibrator 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibrator 5 (25,0 ng/mL)	2.01

## 9. QUALITY CONTROL

- It is recommended that internal controls are used in every assay in duplicate. Control results should be within established ranges and should preferably represent low, medium, and high concentrations.
- The risk for the patient is mainly due to false negative results around the reschild (cut-off) value of PSA < 4.0 ng/mL. It is therefore highly recommended to validate the kit and laboratory via external trials (e.g. DGKC).

## 10. EXPECTED VALUES AND LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

The generally recommended threshold for follow-up examinations is:

Cut-off value: 3.0-4.0 ng PSA /mL

Healthy men generally have a PSA concentration lower than 4.0 ng/mL. If the PSA concentration is equal or higher than 4.0 ng/ml follow-up examinations are highly recommended. This PSA concentration indicates an elevated risk for prostate cancer but might also be caused by BPH.

Please note that that the 4 ng/ml threshold is only a guideline value. In the literature it is discussed that modifications according to age and ethnological background might be useful e.g. that for younger men the threshold should be lower than for older men. If possible, it is recommended for each laboratory to establish its own specific values that take into consideration a population indigenous to the area where the laboratory is located.

It is important to keep in mind that some prostate tumors do not cause elevated PSA levels so that PSA measurements should never replace DRE but should only be used in conjunction with DRE.

As elevated PSA levels might also be caused by non-cancerous conditions follow examinations might try to increase the diagnostic specificity of t-PSA values. In the literature PSA density, PSA velocity and the ratio of f-PSA to t-PSA are discussed to improve discrimination between cancerous and non-cancerous conditions and might be used to reduce unnecessary prostate biopsies. But only a prostate biopsy can finally show if a prostate carcinoma is present or not.

**Note: PSA values can only be used to estimate the cancer risk. They should always be interpreted in conjunction with other clinical findings and should not be used as a sole basis for prostate cancer diagnosis.**

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Detection limit

The limit of detection for this kit is 0.2 ng/mL.

### 11.2. Precision

Intra- and inter-assay precisions were established by analysing three patient sera of different PSA concentrations. The results are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. Intra-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Table 2. Inter-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

### 11.3. Recovery

A known amount of PSA was added to three patient sera and the quantities recovered were measured. The results are shown in Table 3.

Table 3. Recovery

Sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

### 11.4. Specificity

The antibodies used in this kit are highly specific for total PSA (free PSA & PSA-ACT-complex), with a relatively low cross-reactivity to other proteins and polypeptides, lipids or chemotherapeutic agents that might be present in patient samples.

Table 4. Specificity

Antigens	Amount added	Cross reaction
<b>Proteins</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactalbumin	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Interfering substances</b>		
Bilirubin	0.2 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
Triglyceride	15 mg/mL	No
<b>Chemotherapeutic Agents</b>		
Cyclophosphamide	800 µg/mL	No
Doxorubicin * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Methotrexate	50 µg/mL	No

\* at higher concentration hemoglobin results in too high OD values, hemolytic samples should thus be avoided.

### 11.5. High dose hook effect

The assay was tested for a high dose hook effect. Up to a PSA concentration of 2000 ng/mL no hook effect was observed. Please note that if the OD is out of the standard range for highly concentrated samples, the sample must be diluted before the next measurement to obtain correct results.

### 11.6. Correlation

Diametra Total PSA ELISA was compared with the Roche ElecSys total PSA:

$$Y = 0.9644 * X + 0.0741$$

In a second study Diametra Total PSA ELISA was compared to another CE registered PSA ELISA:

$$Y = 1.001 * X, R^2 = 0.9704$$

## 12. LEGAL ASPECTS

### 12.1. Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Diametra.

## 12.2. Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 12.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

## 12.3. Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 12.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 13. BIBLIOGRAPHY

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Hulan H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

**Ed. 01/2015**

**DCM137-2**

**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)



DCM137-2  
Ed. 01/2015

# Total PSA

para análisis diagnóstico

Prueba inmunoenzimática para la determinación cuantitativa del PSA (Antígeno Prostático Específico) total en suero o plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  test

REF DKO137

## USO PREVISTO

EL Kit Diametra Total PSA se utiliza para la determinación cuantitativa del antígeno prostático específico en suero o plasma humano. La cuantificación de los niveles de PSA total se utiliza, en los hombres, para estimar el riesgo de un carcinoma prostático en conjunto con la técnica del tacto prostático o bien para monitorear la eficiencia del tratamiento en pacientes con carcinoma de la próstata.

## 1. IMPORTANCIA CLINICA

EL cancer de la prostata es el más frecuente tipo de tumor en el hombre y es el segundo causante de mortalidad en el hombre entre los tumores.

Hasta hace poco el tacto rectal ha sido utilizado como única modalidad de diagnóstico del tumor prostático en la fase inicial. En los últimos años la determinación de los niveles séricos del PSA se convirtió la metodología mas aceptada para mejorar la especificidad diagnóstica del tacto rectal. Aun siendo una proteína tejido especifica y no solamente tumor especifica el PSA se ha convertido en el marcador más importante del carcinoma prostático, demostrando una especificidad mejor de otros marcadores bioquímicos utilizados en este contexto (PAP, fosfatasa alcalina total, CEA, etc.)

En el 1979, Wang et al. Aislaron un antígeno específico y lo llamaron PSA. Como quedó demostrado por estudios inmunohistológicos el PSA se localiza en el citoplasma de las células prostáticas, en el epitelio del ducto y en la secreción de la lamina ductal, todos tejidos normales de la próstata así como en los tejidos hiperplásicos benignos o malignos y en el cáncer metastáticos. Si la integridad estructural de la próstata se altera y/o las dimensiones de la glándula aumentan, la cantidad de PSA circulante se puede elevar. Un aumento de la concentración de PSA a valores superiores de 3-4ng/mL se ha reportado en pacientes con hipertrofia prostática benigna (HPB) o en pacientes con carcinoma prostático. A partir de este umbral se aconsejan exámenes de seguimiento que permiten diferenciar entre estas dos condiciones.

La determinación de los niveles séricos de PSA es importante también para monitorear pacientes que han sido tratados por esta patología. Las mediciones periódicas del PSA se vuelven un importante instrumento para examinar la eficacia de la cirugía o bien otras terapias. Un aumento del PSA en pacientes tratados puede permitir un precoz diagnóstico de un carcinoma residual o recurrente.

## 2. PRINCIPIO DEL METODO

Este kit es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA) basado sobre la metodología de "sandwich".

Los pozos de la microplaca son revestidos con un anticuerpo dirigido hacia un epítipo del PSA. Una alícuota del suero del paciente se incuba en los pozos junto a un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (E-Ab) dirigido hacia otra región de la molécula de PSA. Después de la incubación la fracción E-Ab no ligada se lava y la cantidad de E-Ab ligada es proporcional a la concentración sérica del PSA. Después de añadirse la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de PSA presente en la muestra. Las densidades ópticas de los Calibradores se utilizan para trazar una curva de calibración contra la cual se calculan las concentraciones de las muestras.

## 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

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

1. Calibradores de PSA (6 viales, 0.5 mL cada uno)

CAL0/Diluyente de muestra(10 mL) REF DCE002/13706-0

CAL1 REF DCE002/13707-0

CAL2 REF DCE002/13708-0

CAL3 REF DCE002/13709-0

CAL4 REF DCE002/13710-0

CAL5 REF DCE002/13711-0

Contienen conservante sin mercurio

2. Controles (2 flacone, 0.5 mL cada uno)

La concentración se indica en el certificado de análisis.

Contienen conservante sin mercurio.

Control bajo REF DCE045/13701-0

Control alto REF DCE045/13702-0

3. Microplaca revestida (1 microplaca)

Anticuerpo monoclonal anti PSA absorbido en la microplaca

REF DCE002/13703-0

4. Enzima Conjugado (1 vial, 12 mL)

Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contienen conservante sin mercurio.

REF DCE002/13702-0

5. Solución Sustrato (1 vial, 12 mL)

Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

REF DCE004/13704-0

6. Solución de Parada (1 vial, 14 mL)

Contiene ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras)

REF DCE005/13705-0

### 3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

- Agua destilada.
- Pipetas automaticas (volumén: 25 µL e 100 µL) con puntas desechables.
- Lector ELISA con filtros de 450 nm y 630 nm.
- Cronometro.
- Lavador microplacas (opcional).
- Vortex o instrumento para mezclar.
- Contenedor para el correcto manejo de los desechos.

### 4. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- Almacenar el Kit y sus componentes a 2-8°C.
- Llevar a temperatura ambiente (18-25°C) el kit por lo menos 30 minutos antes de usarse. Después del uso volver a refrigerar. Evitar exponer el kit a temperatura ambiente por periodos largos.
- No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta de la caja.
- Después de su uso cerrar correctamente los viales.
- Conservar la microplaca y su desecante en la bolsa (zip-lock). Los pozos no utilizados deberán conservarse siempre en las condiciones descritas.
- Asegurarse que los componentes del kit no se congelen.

### 5. PRECAUCIONES

- Los Kits ELISA son diseñados solamente para usarse en el diagnostico in vitro por parte de profesionales en el área de la diagnostica.
- Las muestras de suero y/o plasma humano deben ser tratadas como potencialmente infectocontagiosas. Utilizar guantes. No comer, beber o fumar en las áreas del laboratorio en las cuales se manejan los kits. No pipetear con la boca, en caso de contacto con la piel lavar con un jabón germicida y abundante agua, consultar a un medico si fuera necesario.
- Sea los Calibradores que los controles de este kit son de origen humana. Han sido probados y confirmados negativos para HIV, HBsAg y HCV. De toda forma deben ser manejados como materiales potencialmente infectocontagiosos.
- Debido al carácter potencialmente infectivo de la muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respeto.
- Los reactivos de kit contienen conservantes, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido sulfúrico y pueden ser dañinos si ingeridos. Evitarse el contacto directo con la piel, en caso de contacto lavase con abundante agua de ser necesario consulte su médico
- La solución de parada contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sustancia corrosiva, por lo tanto es conveniente limpiar la instrumentación utilizada para la dispensación.
- No intercambiar los reactivos de lotes o proveedores distintos.
- Úsese únicamente puntas desechables para evitar contaminaciones.
- No utilice el kit si la confección de la microplaca o de los viales luzcan dañados.

### 6. GUIA PARA LA EXTRACCION, PREPARACION Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS.

#### 6.1. Extracción de la muestra

Las muestra de sangre se extraen por punción venosa, debido a que los niveles de PSA se ven afectados por una variedad de factores, el médico debe asegurarse que el paciente observe ciertas indicaciones antes del muestreo. Las siguientes condiciones pueden alterar los reales niveles de PSA aumentándolos:

- Ciclismo

- Sexo (eyaculación)
- Tacto prostático, ecografía prostática transrectal, etc.
- Prostatitis
- Disfunción hepática.

Las siguientes condiciones pueden alterar los reales valores de PSA disminuyéndolos:

- Terapia con inhibidores de la 5-alfa-reductasa, anti andrógenos o bien análogos de la GnRH.

#### 6.2. Preparación de la muestra

La preparación de las muestras séricas o plasmáticas se realiza según la técnica estándar por centrifugación, la separación de la muestra debe realizarse a la brevedad para evitar hemolisis y mejorar la estabilidad del PSA.

#### 6.3. Conservación de las muestras

Para la prueba pueden usarse suero o plasma recién extraídos, si la prueba no se realiza inmediatamente las muestras pueden almacenarse a 2-8°C por 1 semana. Si se requiere conservar la muestra por periodos prolongados congelar a -20°C. Evitar congelar y descongelar repetidas veces.

#### Nota

- Las muestras fuertemente lipemicas o hemolíticas pueden producir resultados erróneos.
- Las muestras deben ser exentes de contaminación microbiológica.
- Las muestras con valores elevados de Factor Reumatoide y/o anticuerpos anti-topo pueden producir resultados erróneos.

### 7. PROCEDIMIENTO

#### 7.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

Los Calibradores han sido calibrados contra el WHO 96/670 y tienen las siguientes concentraciones:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	1,56	3,12	6,25	12,50	25,00

Contienen conservante.

#### 7.2. Procedimiento

Nota: se aconseja trabajar en duplicado, en cada medición debería realizarse una curva de calibración. Para obtener mejores resultados y más reproducibles es importante que las soluciones se añadan siempre en el mismo orden.

- Antes del uso llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificar que ningún componente este vencido o dañado.
- Tomar los pozos necesarios, teniendo presente que las mediciones deberían ser efectuadas en duplicado. Documentar la posición de los Calibradores, controles y muestras y devolver al sobre los pozos sobrantes cerrar bien, controlar que el desecante este en el sobre y almacenar a 2-8°C.
- Las muestras con un valor de PSA superior de 25ng/mL deben ser diluidas don el diluyente de muestra.



Reactivos	Calibrador	Muestra	Control
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Control			25 µL
Muestra		25 µL	
Incubar 5 minutos a temperatura ambiente (18-25°C).			
Enzyme Conjugado	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec).</p> <p>Incubar 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C).</p> <p>Descartar la solución de los pozos por aspiración o decantación; si utiliza la decantación remover el remanente de líquido del pozo golpeando la placa sobre una servilleta.</p> <p>Lavar llenando los pozos con agua destilada durante 15 segundos, repetir 5 o 6 veces.</p> <p><u>Procedimiento recomendado:</u> lavar los pozos 6 veces con 250µL de agua destilada, preferiblemente utilice un lavador automático. Si lava manualmente cuide de dejar la solución de lavado el mismo tiempo en cada pozo esto para minimizar el coeficiente de variación.</p>			
Solución Substrato	100 µL	100 µL	100 µL
Incuba 20 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en oscura.			
Solución de Parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agite delicadamente la microplaca.</p> <p>Leer la absorbancia (OD) a 450 nm (contra referencia a 630 nm)</p>			

## 8. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcular la media de los valores de absorbancia obtenida por cada set de calibradores, controles y muestras.
2. Usando papel milimetrado trazar una curva de calibración graficando la absorbancia promedio de cada calibrador versus su concentración. El valor de absorbancia en el eje Y y el de concentración en el eje X.
3. Utilizando el valor promedio de absorbancia de cada muestra, determine la concentración interpolando el dato sobre la curva obtenida.
4. Método automático: los resultados pueden calcularse automáticamente utilizando un tratamiento logístico de 4 parámetros. Esta forma de tratar los datos es la más idónea, otros análisis de datos pueden producir resultados ligeramente distintos.
5. La concentración de las muestras pueden ser leídas a partir de esta curva estándar. Las muestras con concentraciones superiores a 25 ng/mL deben ser diluidas o bien reportadas como >25 ng/mL. Recuérdese tomar en cuenta el factor de dilución en el cálculo de la concentración cuando la muestra ha sido previamente diluida.

### 8.1. Ejemplo de una curva de calibración típica

Los datos a continuación son ejemplificativos no deben utilizarse para el cálculo de sus resultados.

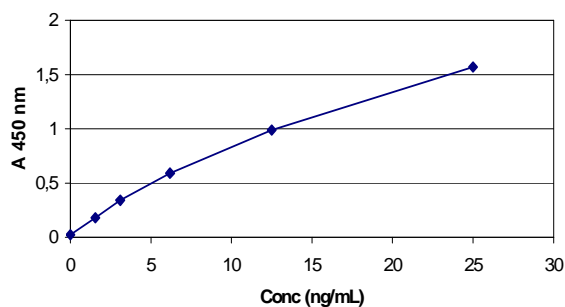
Calibrador	ABS (450 nm)
Calibrador 0 (0 ng/mL)	0.05
Calibrador 1 (1,56 ng/mL)	0.24
Calibrador 2 (3,12 ng/mL)	0.39
Calibrador 3 (6,25 ng/mL)	0.74
Calibrador 4 (12.5 ng/mL)	1.27
Calibrador 5 (25,0 ng/mL)	2.01

## 9. Validación de la prueba

1. La absorbancia del Calibrador 0 a 450nm debe ser menor a 0.150, valores superiores indican una contaminación cromógeno/sustrato. En este caso repetir la prueba controlando el reactivo.
2. La absorbancia del Calibrador 25 ng/mL a 450nm debe ser superior a 0.700. Valores menores indican decaimiento del kit. Controlar la fecha de vencimiento del kit antes de repetir la prueba.
3. EL suero control incluido en el kit no debe variar más del 15% de la concentración declarada en la etiqueta, si se trabajó por lo menos en duplicado
4. Hoja de trabajo y curva de calibración de una corrida típica (no se utilice para el cálculo de muestras reales):

Pozo	Contenido	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	St 0 ng/mL	0.022	0,023	
3-4	St 1,56 ng/mL	0.178	0.180	
5-6	St 3,12 ng/mL	0.337	0.342	
7-8	St 6,20 ng/mL	0.611	0.568	
9-10	St 12,50 ng/mL	0.990	0.984	
11-12	St 25,00 ng/mL	1.574	1.562	
13-14	control	0.421	0.400	3.98

## PSA



Nótese que los valores absolutos de absorbancia para los Calibradores pueden variar debido a cambios de temperatura y por el envejecimiento del conjugado. Los resultados de PSA de las muestras son validos mientras los valores de absorbancia de los Calibradores cumplan con los intervalos permitidos y las concentraciones de los sueros controles cumplan con los rangos esperados.

## 9. Control de Calidad

- Se recomienda que los controles internos se utilicen en duplicado en cada análisis. Los resultados obtenidos deben estar en el rango permitido. Es recomendable utilizar controles en los niveles bajos, medianos y altos.
- El riesgo para el paciente se da con valores falsamente negativos limítrofes al valor de cut off de PSA



<4.0ng/mL. Por lo tanto es aconsejable validar el kit con procedimientos externos (por ejemplo DGKC).

## 10. Valores esperados y limitaciones del test

El límite generalmente recomendado para solicitar análisis de seguimiento es:

Valor de cut-off: 3,0-4,0 ng PSA / mL

Hombres saludables presentan por lo general una concentración de PSA menor de 4.0ng/mL. De presentarse una concentración superior es altamente recomendable realizar exámenes de seguimiento. Concentraciones de PSA superiores a 4.0ng/mL pueden indicar un cáncer a la próstata o una hiperplasia prostática benigna. Tome en cuenta que el valor umbral de 4 es únicamente indicativo en la literatura se reportan correcciones debidas a la edad y grupos étnicos que pueden resultar útiles. Por ejemplo en hombres jóvenes el límite debería ser menor que el de hombres ancianos, de ser posible es aconsejable que el laboratorio fije sus límites dependiendo de los factores locales. Es importante recordar que algunos cánceres prostáticos no producen aumentos elevados del PSA y por lo tanto la prueba nunca debería sustituir el tacto prostático sino que utilizada en combinación.

Debido a que pueden encontrarse niveles de PSA aumentados sin que se trate de cáncer, ulteriores exámenes podrían incrementar el valor diagnóstico de la t-PSA. La literatura cita que la densidad de PSA, la velocidad de PSA y la relación entre f-PSA/t-PSA aumentan la capacidad de discriminación entre procesos cancerosos y no cancerosos y que estas técnicas podrían utilizarse para reducir el número de biopsias innecesarias. Pero solo una biopsia prostática puede claramente discriminar si el carcinoma es presente o no.

**Nota: los valores de PSA pueden utilizarse únicamente para estimar el riesgo de cáncer. Se deben siempre interpretar en combinación con otros resultados clínicos y nunca se deben utilizar como único diagnóstico del carcinoma prostático.**

## 11. PRESTACIONES CARACTERISTICAS

### 11.1. Limite de detección

El limite de detección de este kit es: 0.2 ng/mL.

### 11.2. Precisión

La precisión inter y entre ensayo ha sido establecida utilizando tres sueros de pacientes con diferentes concentraciones de PSA, los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1. Entre -ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	24	12.52	0.65	6.0
2	24	3.44	0.13	3.9
3	32	0.83	0.07	8.8

Tabla 2. Inter-ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	4	12.28	0.82	6.7
2	4	3.33	0.266	7.98

## 11.3. Recuperación

Una cantidad conocida de PSA se agregó a tres sueros de pacientes y luego ha sido medida la cantidad recuperada. Los resultados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Recuperación

Muestra	Valor esperado (ng/mL)	Valor Observado (ng/mL)	Recuperación%
1	6.30	6.40	102
2	4.67	4.56	98
3	10.10	10.91	108

## 11.4. Especificidad

Los anticuerpos utilizados en este kit son altamente específicos para la PSA total (PSA libre y PSA-ACT-complejo), con una reactividad cruzada baja con otras proteínas, polipéptidos, lípidos o agentes quimioterapicos que podrían estar presente en el suero de los pacientes.

Tabla 4. Especificidad

Antigenos	Cantidad Agregada	Reacción Cruzada
<b>Proteínas</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Sustancias Interferentes</b>		
Bilirrubina	0.2 mg/mL	No
Hemoglobina*	0.1 mg/ml	No
Trigliceridos	15 mg/mL	No
<b>Agentes quimioterapicos</b>		
Ciclofosfamida	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Dietilstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutamida	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

\* a valores mas altos la hemoglobina produce absorbancias elevadas, por lo tanto los sueros hemolizados deberian ser descartados

## 11.5. Efecto Hook

Hasta una concentración de PSA de 2000ng/mL no ha sido observado ningún efecto gancho. Nótese que si la absorbancia de una muestra es superior a la absorbancia del ultimo Calibrador, la muestra debe ser diluida y medida otra vez.

## 11.6. Correlacion

El kit Diametra Total PSA ELISA ha sido comparado con el kit de Roche ElecSys Total PSA:

$$Y = 0.9644 * X + 0.0741$$

En un segundo estudio el kit Diametra Total PSA ha sido comparado con otro kit ELISA para PSA marcado CE:

$$Y = 1.001 * X, R^2 = 0.9704$$

## 12. ASPECTOS LEGALES

### 12.1. Fiabilidad de los resultados

El test se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante. Además el usuario debe respetar las normas GLP (Buenas prácticas de laboratorio) y/o otras normas nacionales así como las leyes vigentes. Esto es particularmente relevante para el uso de reactivos de control. Durante el procedimiento es importante incluir siempre un número suficientes de controles para validar el funcionamiento del test.

Los resultados del test son validos si todos los controles están en el rango especificado, además se deben revisar que los demás parámetros de prueba cumplan con las especificaciones del ensayo. En caso de dudas contacten Diametra.

### 12.2. Decisiones terapéuticas

Las decisiones terapéuticas jamás deben basarse únicamente sobre los resultados de laboratorio, aun si todos los resultados cumplen con lo especificado en el punto 12.1. El resultado del laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico general del paciente. Únicamente en los casos en los cuales los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente deben tomarse decisiones terapéuticas. El resultado del test por si solo no es factor determinante para decidir tratamientos terapéuticos.

### 12.3. Responsabilidad

Cualquiera modificación del Kit y/o el intercambio o mezcla de componentes de lotes distintitos de un kit a otro pueden modificar los resultados esperados y la validez en general del ensayo. Tales modificaciones y/o intercambio anulan cualquier solicitud de sustitución y/o reposición. Los reclamos debidos a una equivocada interpretación de los resultados de laboratorio por parte de los clientes según indicado en el punto 12.2. tampoco son validos. Independientemente de lo anterior in caso de cualquier reclamo, la responsabilidad del fabricante no supera el valor del kit. Daños provocados al kit durante el transporte no son responsabilidad del fabricante.

## 13. BIBLIOGRAFIA

- Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
- Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
- Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
- Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
- Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
- Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
- Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer

- Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351

Ed. 01/2015

DCM137-2

**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)

	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



DCM138-3  
Ed. 01/2015

## Free PSA

per analisi di routine

Saggio immunoenzimatico per la determinazione quantitativa della PSA (Prostata Specific Antigen) libera in siero e plasma umano

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$  test

REF DKO138

### DESTINAZIONE D'USO

Il kit Diametra Free PSA ELISA è utilizzato per la determinazione quantitativa della PSA libera (f-PSA) nel siero o plasma. La determinazione dei livelli di f-PSA viene generalmente utilizzata in combinazione con la misura del PSA totale (t-PSA) per determinare il rapporto tra f-PSA e t-PSA. Questo rapporto contribuisce a stimare il rischio per il cancro alla prostata e a discriminare gli elevati livelli di t-PSA causati da condizioni non-cancerose da quelli causati da condizioni cancerose. La determinazione della f-PSA è particolarmente indicata per gli uomini con elevati livelli di t-PSA e risultati negativi con l'esplorazione rettale digitale (DRE), al fine di decidere se è necessaria una seconda biopsia della prostata.

### 1. SIGNIFICATO CLINICO

Il cancro alla prostata è il tipo più frequente di tumore scoperto nell'uomo ed è la seconda causa di morte per tumore nei maschi. Fino a poco tempo fa, l'esplorazione rettale digitale (DRE) è stata spesso utilizzata come unica modalità di diagnosi per l'individuazione del tumore alla prostata nelle fasi iniziali. Negli ultimi anni la determinazione dei livelli sierici di PSA è diventato il metodo più accettato per migliorare la specificità diagnostica del DRE. Anche se è una proteina tessuto-specifica e non è solo tumore-specifica, la PSA è diventata il marcatore più importante per il carcinoma alla prostata, mostrando una specificità migliore di altri marcatori biochimici utilizzati in questo contesto (PAP, fosfatasi alcalina totale, l'antigene carcinoembrionario, ecc).

Nel 1979, Wang et al. isolarono un antigene specifico per il tessuto prostatico normale e chiamarono questa proteina PSA. La PSA è una serina-proteasi di 33 kDa. Studi immunostologici hanno dimostrato che la PSA è localizzata nel citoplasma delle cellule acinose della prostata, dell'epitelio duttale e nella secrezione del lumina duttale, presente nei tessuti della prostata normali, benigni iperplastici e maligni, così come nel cancro metastatico della prostata e nel liquido seminale. Se l'integrità strutturale della prostata è alterata e/o le dimensioni della ghiandola aumentano, la quantità di PSA nel plasma sanguigno può diventare elevata. Nel plasma sanguigno, la maggior parte della PSA forma complessi con vari inibitori delle proteinasi. Solo una piccola frazione di PSA circola come PSA libera inattiva. Fondamentalmente possono essere distinte tre principali forme di PSA, di cui solo due sono immunoreattive. La forma predominante di PSA è un complesso con l' $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT-PSA). La PSA libera (f-PSA) rappresenta circa il 10-40% della PSA immunologicamente rilevabile. La quantità totale della PSA immunoreattiva è conosciuta come PSA totale (t-PSA). La PSA complessata all' $\alpha$ -2-macroglobulina non può essere

rilevata da analisi immunologiche ed è quindi frequentemente chiamata PSA occulta (o-PSA).

Gli attuali metodi di screening per il cancro alla prostata negli uomini utilizzano la rilevazione della t-PSA. Livelli di 4,0 ng/mL o superiori sono forti indicatori della possibilità di carcinoma prostatico e sono un'indicazione per gli esami di follow-up del paziente. Tuttavia, elevati livelli sierici di PSA sono spesso anche attribuiti a iperplasia prostatica benigna, e provocano una elevata percentuale di risultati falsi positivi negli screening. Una possibile soluzione a questo problema implica la determinazione dei livelli di PSA libera. Alcuni studi hanno suggerito che la percentuale di PSA libera è più bassa nei pazienti con cancro alla prostata rispetto a quelli con iperplasia prostatica benigna. Pertanto, la misurazione della PSA libera in collaborazione con la PSA totale può migliorare la specificità dello screening del cancro alla prostata negli uomini con elevati livelli sierici di PSA totale, il che farebbe successivamente ridurre inutili biopsie prostatiche, con effetti minimi sui tassi di rilevazione del cancro.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Questo kit è un saggio immunoenzimatico in fase solida (ELISA).

I pozzetti della micropiastra sono rivestiti con un anticorpo monoclonale anti f-PSA diretto contro un epitopo della molecola antigenica. Un'aliquota di siero del paziente viene incubato nei pozzetti coattati insieme ad un secondo anticorpo coniugato ad un enzima (E-Ab), diretto verso una differente regione della molecola antigenica. Dopo incubazione, la frazione E-Ab non legata è lavata via. La quantità di E-Ab legato è proporzionale alla concentrazione di antigene nel campione. Dopo aver aggiunto la soluzione di substrato, l'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di antigene presente nel campione. Le densità ottiche dei Calibratori sono utilizzate per costruire una curva di calibrazione contro la quale vengono calcolate le concentrazioni di f-PSA sconosciute dei campioni.

### 3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

#### 3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. PSA Calibrators (6 flaconi, 0,5 mL ciascuno)  
CAL0 / Sample Diluent (10 mL) **REF DCE002/13806-0**  
CAL1 **REF DCE002/13807-0**  
CAL2 **REF DCE002/13808-0**  
CAL3 **REF DCE002/13809-0**  
CAL4 **REF DCE002/13810-0**  
CAL5 **REF DCE002/13811-0**

Contengono un conservante privo di mercurio.

2. Controls (2 flaconi, 0,5 mL ciascuno)  
Low Control **REF DCE045/13804-0**  
High Control **REF DCE045/13805-0**

La concentrazione è indicata sul Certificato di Analisi.

Contiene un conservante privo di mercurio.

3. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)  
Anticorpo monoclonale anti PSA assorbito sulla micropiastra **REF DCE002/13803-0**

4. Assay Reagent (1 flacone, 6 mL)  
Contiene un conservante privo di mercurio. **REF DCE043/13843-0**

5. Enzyme Conjugate (1 flacone, 6 mL)  
Anticorpo anti PSA coniugato a perossidasi di rafano (HRP). Contiene un preservante privo di mercurio. **REF DCE002/13802-0**

6. 40X Wash Buffer (1 flacone, 25 mL)  
Diluire con acqua distillata prima dell'uso. **REF DCE057/13857-0**

7. Substrate Solution (1 flacone, 12 mL)  
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> **REF DCE004/13804-0**

8. Stop Solution (1 flacone, 14 mL)  
Contiene acido solforico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (evitare il contatto, può causare irritazioni e bruciature) **REF DCE005/13805-0**

#### 3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

- Micropipette di precisione (volume: 25 microlitri e 100 microlitri) con punte monouso
- Acqua distillata
- Spettrofotometro ELISA con filtri a 450 nm e 630 nm
- Timer con 60 minuti di intervallo o superiore
- Lavatore di micropiastre (opzionale)
- Vortex o strumenti similari di miscelazione
- Contenitore per la corretta gestione dei rifiuti e dei campioni dopo l'uso.

#### 4. CONSERVAZIONE E STABILITÀ

- Conservare il kit e i componenti a 2-8°C.
- Portare i componenti a temperatura ambiente (18-25°C) almeno 30 minuti prima dell'uso. Dopo l'uso rimettere in frigorifero. Evitare la conservazione a temperatura ambiente per molto tempo.
- Non utilizzare il kit o i componenti dopo la data di scadenza. Per la data di scadenza del kit originale imballato vedere sull'etichetta del kit.
- Chiudere le bottiglie subito dopo l'uso.
- Conservare la piastra incluso l'essiccante nell'apposita tasca con zip-lock. Le strip non utilizzate devono essere sempre archiviate in questa condizione.
- Assicurarsi che i componenti del kit non congelino.
- Una volta aperto, il kit mantiene la sua attività per 2 mesi se conservato come descritto sopra.

### 5. PRECAUZIONI

- Il kit è solo per uso diagnostico in vitro e deve essere usato da professionisti.
- I campioni di siero e plasma devono essere trattati come materiali potenzialmente infettivi. Indossare guanti ed indumenti da laboratorio quando si maneggiano materiali campione. Non mangiare, bere o fumare nelle aree in cui vengono gestiti i campioni o i reagenti del kit. Non pipettare con la bocca. In caso di contatto con la pelle, lavare con un sapone germicida e acqua abbondante. Consultare un medico se indicato.
- I Calibratori di PSA ed i controlli sono di origine umana. Essi sono stati testati e confermati negativi per HIV, HBsAg e HCV. Tuttavia, tutti i Calibratori dovrebbero essere trattati come materiali potenzialmente infetti.
- Dato il carattere potenzialmente infettivo dei campioni e dei componenti del kit, tutti i materiali che sono venuti a contatto con questi materiali dovrebbero essere sterilizzati e smaltiti secondo le normative locali. Questo include anche i rifiuti liquidi.
- I reagenti del test contengono conservanti, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o acido solforico e possono essere dannosi se ingeriti. Il contatto diretto con la pelle o la mucosa dovrebbe essere evitato. In caso di contatto con la pelle, lavare abbondantemente con acqua e consultare un medico se necessario.
- La soluzione bloccante contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Poiché l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> utilizzata per bloccare la reazione colorimetrica è corrosiva, la strumentazione utilizzata per la dispensazione deve essere accuratamente pulita dopo l'uso.
- Non scambiare reagenti di lotti diversi o fornitori diversi.
- Evitare la contaminazione di reagenti o campioni utilizzando puntali usa e getta.
- Non utilizzare il kit se la confezione della micropiastra o le bottiglie sono state danneggiate.

### 6. GUIDA PER LA RACCOLTA, PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

#### 6.1. Raccolta del campione

I campioni di sangue vengono raccolti per venipuntura. Poiché diversi fattori possono influenzare il livello di PSA nel sangue, i medici devono assicurarsi che il paziente abbia evitato le seguenti condizioni prima di prendere il campione di sangue.

Le seguenti condizioni possono portare ad un aumento dei livelli di PSA:

- bicicletta
- rapporto sessuale (eiaculazione)
- manipolazione della prostata durante le visite mediche come DRE, ecografia prostatica transrettale, ecc. Si prega di notare che il DRE in particolar modo può portare ad un aumento della sola f-PSA, cosicché il carcinoma potrebbe essere trascurato.
- prostatite
- disfunzione epatica

Le seguenti condizioni possono portare ad una diminuzione dei livelli di PSA:

- assunzione di inibitori per la 5-alfa-reduttasi, antiandrogeni, o GnRH- analoghi

#### 6.2. Preparazione del campione

La preparazione dei campioni di siero o plasma viene eseguita secondo le tecniche standard. Siero o plasma deve essere preparati al più presto per evitare l'emolisi e migliorare la stabilità della PSA.

### 6.3. Conservazione dei campioni

Per il dosaggio possono essere utilizzati siero o plasma freschi. La f-PSA non è così stabile come la t-PSA.

In letteratura (Thomas, 2008) è raccomandato di misurare i campioni entro 24 ore. In caso di conservazione prolungata, congelare a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento e scongelamento dei campioni.

#### Nota

- I campioni fortemente lipemici o emolitici possono dare risultati analitici errati.
- I campioni devono essere esenti da contaminazioni microbiche.
- I campioni contenenti alti titoli di fattore reumatoide ed anticorpi umani anti-topo (HAMA) potrebbero fornire risultati errati.

## 7. PROCEDURA DEL SAGGIO

### 7.1. Preparazione dei Calibratori (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

I Calibratori sono calibrati contro il WHO 96/668 e hanno le seguenti concentrazioni:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0,75	1,50	3	6	12

Contengono un conservante.

### 7.2. Preparazione della Wash Solution

Prima di iniziare il test, la soluzione di lavaggio deve essere diluita fino alla giusta concentrazione. Per ogni pozzetto sono necessari circa 2 mL di soluzione di lavaggio diluita. Calcolare il volume della soluzione necessaria per il dosaggio. Prendere 1/40 del volume della soluzione di lavaggio concentrata e diluire con 39/40 del volume di acqua distillata.

### 7.3. Procedura del test

Nota: si consiglia di effettuare tutte le misurazioni in duplicato. Per ogni serie di misurazioni dovrebbe essere eseguita una curva di calibrazione indipendente. Per ottenere i migliori risultati, è importante che le soluzioni siano sempre aggiunte ai pozzetti nello stesso ordine, al fine di minimizzare le variazioni nei tempi di incubazione.

- Prima dell'uso, portare tutti i reagenti, calibratori, controlli e campioni a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificare che tutti i componenti non siano scaduti e verificare che le bottiglie e la piastra (sacchetto compreso) non siano danneggiati.
- Prelevare le strip necessarie, tenendo presente che tutte le misurazioni devono essere effettuate in duplicato. Documentare la posizione dei pozzetti e dei rispettivi campioni, calibratori e controlli per garantire l'identificazione dopo il saggio. Riporre tutte le strip inutilizzate nella busta con la zip-lock insieme al sacchetto essiccante, sigillare e conservare a 2-8°C.
- I campioni con un valore previsto di f-PSA superiori a 25 ng/mL devono essere diluiti con il sample diluent.

Reagenti	Calibratori	Campione	Controllo
Calibratore C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Controllo			25 µL
Campione		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Miscelare la soluzione muovendo la micropiastra sul tavolo per 10 secondi. Incubare 1 h a temperatura ambiente (18-25°C)			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 µL
Miscelare bene muovendo la piastra sul tavolo (10 sec). Incubare 1 h a temperatura ambiente (18-25°C). Rimuovere la soluzione dai pozzetti per aspirazione o decantazione; per la decantazione, battere leggermente la piastra su carta assorbente per rimuovere il liquido residuo. Per il lavaggio riempire i pozzetti con la soluzione di lavaggio diluita e aspettare 10 secondi prima di rimuovere la soluzione; ripetere il lavaggio 5 (per un totale di 6 volte). <u>Procedura raccomandata:</u> lavare i pozzetti 6 volte con 250-300 µL di soluzione di lavaggio diluita per pozzetto. Preferibilmente utilizzare una procedura di lavaggio automatizzata. Se si lava manualmente, fare attenzione che la soluzione di lavaggio rimanga in ogni pozzetto lo stesso tempo. Questo è necessario per ottenere valori di CV il più bassi possibile.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (18-25°C) al buio.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (OD) a 450 nm (azzerando a 630nm)			

#### Risultati:

1. Calcolare l'assorbanza media per ogni duplicato.
2. Sottrarre il valore di assorbanza del calibratore zero dai valori di assorbanza media di calibratori, controllo e campioni.
3. Disegnare la curva di calibrazione in una carta per grafici lin-lin o log-log, riportando i valori di assorbanza dei calibratori contro le concentrazioni di PSA appropriate.
4. Leggere le concentrazioni di f-PSA per il controllo e i campioni.

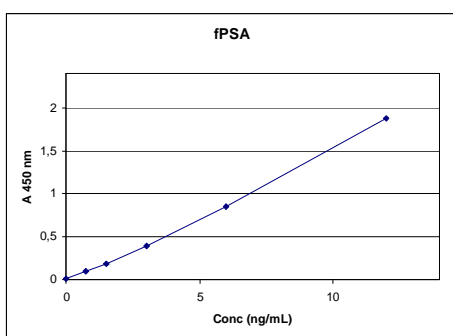
#### 8. VALIDITA' DEL SAGGIO

1. La OD 450 nm del pozzetto del Calibratore 0 è inferiore a 0,150. Valori più alti indicano una contaminazione cromogeno/substrato. In tal caso, ripetere il test controllando attentamente il reagente.
2. La OD 450 nm del Calibratore più alto (12 ng/mL) deve essere superiore a 0,9. Valori più bassi indicano un decadimento del kit o del controllo. In tal caso, controllare la data di scadenza del kit prima di ripetere il test.
3. Il controllo fornito non dovrebbe differire di non più del 15% dalla concentrazione indicata sull'etichetta del flaconcino, se eseguito almeno in doppio.



4. Foglio di lavoro e curva di calibrazione di un tipico dosaggio (non utilizzare per il calcolo dei risultati delle prove reali):

Pozzetti	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0.011	0,009	
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0.109	0.096	
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0.185	0.179	
7-8	Cal 3 ng/mL	0.393	0.392	
9-10	Cal 6 ng/mL	0.871	0.837	
11-12	Cal 12 ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



Notare che i valori assoluti di OD per i Calibratori possono variare a causa di influenze di temperatura o con l'età del coniugato. I risultati per i campioni di PSA sconosciuti sono validi fino a quando i valori di OD identificano una curva di calibrazione e rimangono all'interno delle specifiche e il controllo mostra il valore atteso,

## 9. CONTROLLO QUALITA'

- Si raccomanda che i controlli interni vengano utilizzati in duplicato in ogni analisi.
- I risultati dei controlli devono essere entro i limiti stabiliti e preferibilmente dovrebbero rappresentare livelli di concentrazione bassi, medi ed alti.

## 10. VALORI ATTESI E LIMITAZIONI DEL TEST

Quando i valori della PSA totale sono nell'intervallo 4-10 ng/mL, il rapporto f-PSA / t-PSA può essere utilizzato per aumentare la specificità diagnostica del test per la PSA. Generalmente la probabilità di una condizione cancerogena aumenta con il diminuire della porzione di f-PSA.

Un rapporto f-PSA / t-PSA del 25% indica in genere una elevata probabilità di BPH (iperplasia prostatica benigna). Un basso valore di f-PSA segnala un probabile cancro alla prostata. La maggior parte degli uomini con cancro alla prostata hanno un valore di f-PSA inferiore al 15%. Se la f-PSA è inferiore al 7% il cancro alla prostata è più probabile. Secondo l'American Cancer Society e il National Cancer Institute, uomini con f-PSA inferiore al 7% devono essere sottoposti a biopsia.

Si prega di notare che un valore isolato di concentrazione di f-PSA non ha alcun valore diagnostico.

Per una discussione dettagliata circa le probabilità di cancro alla prostata e la percentuale di f-PSA vedere anche Gion et al. (1998).

I valori sopra riportati sono solo una guida per l'utente. Se possibile, è consigliabile che ogni laboratorio stabilisca i propri valori specifici, che tengano in considerazione una popolazione indigena della zona dove si trova il laboratorio. **Nota: i valori di PSA e il rapporto f-PSA / t-PSA possono essere utilizzati solo per stimare il rischio di cancro. Essi devono sempre essere interpretati in combinazione con altri risultati clinici e non devono essere utilizzati come unica base per la diagnosi del carcinoma prostatico.**

## 11. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE

### 11.1. Limite di deteazione

Il limite di deteazione per questo kit è 0.1 ng/mL.

### 11.2. Precisione

La precisione intra- ed inter- assay è stata indagata analizzando 3 sieri di pazienti con differente concentrazioni di PSA.

I risultati sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1) *Intra-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Tabella 2) *Inter-assay*

Pazienti	Numero di replicati	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

### 11.3. Recupero

Sono stati preparati campioni sierici arricchiti aggiungendo aliquote di campioni con elevati valori di f-PSA a campioni sierici di uomini sani. Il recupero dell'antigene è nel range 91.8%-116%, con una media del 102%.

Tabella 3) *Recupero*

Campione	Valore atteso (ng/mL)	Valore osservato (ng/mL)	Recupero %
1	5.48	5.47	99,8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91,8
2	2.78	2..81	101
	5.57	5.68	102
3	2.74	2.82	103

### 11.4. Effetto Hook

Non è stato osservato nessun effetto Hook con campioni fino a 5000 ng/mL.

### 11.5. Correlazione

Il kit Diametra Free PSA ELISA è stato comparato con un kit commercialmente disponibile e marcato CE:

$$Y = 0.8922 \cdot X + 0.11; R^2 = 0.8977$$

In un successivo studio, il kit Diametra Free PSA ELISA è stato comparato con un altro kit:

$$Y = 1.0708 \cdot X; R^2 = 0.7969$$

## 11.6. Specificità

Il saggio è altamente specifico per la free PSA, con una cross-reattività relativamente bassa per altre proteine e polipeptidi, lipidi o agenti chemioterapici che possono essere presenti nei campioni dei pazienti.

Tabella 4) Specificità

Antigeni	Quantità aggiunta	Cross- reazione
<b>Proteine</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lattoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Sostanze interferenti</b>		
Bilirubina	0.2 mg/mL	No
Trigliceridi	15 mg/mL	No
Emoglobina	0.1 mg/ml	No
<b>Agenti chemioterapici</b>		No
Ciclofosfamide	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Dietilstilbestrolo	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

\* a più alta concentrazione l'emoglobina dà valori di OD troppo elevati, pertanto i campioni emolitici dovrebbero essere evitati.

## 12. ASPETTI GIURIDICI

### 12.1. Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo le istruzioni del produttore per l'uso. Inoltre l'utente deve rigorosamente rispettare le regole GLP (Good Laboratory Practice) o di altre norme nazionali e/o leggi vigenti.

Questo è particolarmente rilevante per l'uso di reagenti di controllo. All'interno della procedura di prova, è importante includere sempre un numero sufficiente di controlli per validare l'accuratezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi solo se tutti i controlli sono all'interno del range specificato e se tutti gli altri parametri di prova sono anche all'interno delle specifiche del saggio. In caso di qualsiasi dubbio o preoccupazione contattare Diametra.

### 12.2. Conseguenze terapeutiche

Le conseguenze terapeutiche non dovrebbero mai essere basate solamente sui risultati di laboratorio, neanche se tutti i risultati sono in accordo con quanto indicato al punto 12.1. Ogni risultato di laboratorio è solo una parte del quadro clinico complessivo di un paziente.

Solo nei casi in cui i risultati di laboratorio sono in accettabile accordo con il quadro clinico complessivo del paziente devono essere decise conseguenze terapeutiche. Il risultato del test stesso non dovrebbe mai essere l'unico fattore determinante per decidere trattamenti terapeutici.

### 12.3. Responsabilità

Qualsiasi modifica del kit di prova e/o lo scambio o miscelazione di componenti di lotti diversi da un kit ad un altro potrebbe influenzare negativamente i risultati attesi e la validità della prova generale. Tali modifiche e/o scambi annullano qualsiasi tipo di richiesta di sostituzione.

I reclami presentati a causa di un'errata interpretazione dei risultati di laboratorio da parte dei clienti e soggetti al punto 12.2 sono anch'essi non validi. Independentemente da ciò, in caso di qualsiasi reclamo, la responsabilità del produttore non supera il valore del kit. Eventuali danni arrecati al kit per il test durante il trasporto non sono soggetti alla responsabilità del produttore.

## 13. BIBLIOGRAFIA

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

**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)

## Free PSA

for routine analysis

Enzyme immunoassay for the quantitative determination of free PSA (Prostate Specific Antigen) in human serum and plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 test

REF DKO138

### INTENDED USE

Diametra Free PSA ELISA is used for the quantitative determination of free Prostate Specific Antigen (f-PSA) in human serum or plasma samples. The determination of f-PSA levels is generally used in conjunction with a total PSA (t-PSA) measurement to determine the ratio between f-PSA and t-PSA. This ratio helps to estimate the risk for prostate cancer and to discriminate between elevated t-PSA levels caused by cancerous or non-cancerous conditions. F-PSA determinations are especially recommended for men with elevated t-PSA levels and negative results with digital rectal examination (DRE) in order to decide if a second prostate biopsy is indicated.

### 1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Prostate cancer is the most frequent type of cancer found in man and is the second cause of death due to cancer in males. Until recently, digital rectal examination (DRE) was frequently used as only diagnostic modality for the detection of early stages of prostate cancer. In the recent years the determination of serum PSA levels has become the most accepted method to improve the diagnostic specificity of DRE. Although PSA is a tissue specific protein and is not solely tumor specific, it has become the most important marker for prostate carcinoma, showing a better specificity than other biochemical markers used in this context (PAP, total alkaline phosphatase, carcinoembryonic antigen, etc.)

In 1979, Wang et al. isolated a specific antigen for normal prostate tissue and called this protein PSA. PSA is a 33 kDa serine proteinase. Immunohistological studies have shown that PSA is localized in the cytoplasm of prostate acinar cells, ductal epithelium and in the secretion on the ductal lumina, present in normal, benign hyperplastic and malignant prostate tissues as well metastatic prostate cancer and in seminal plasma. If the structural integrity of the prostate is disturbed and/or the gland size is increased, the amount of PSA in the blood plasma may become elevated. In the blood plasma, most of the PSA forms complexes with various proteinase inhibitors. Only a small fraction of PSA circulates as free inactive PSA. Basically three major forms of PSA can be distinguished, only two of which are immunoreactive. The predominant form of PSA is a complex with  $\alpha$ 1-antichymotrypsin (ACT-PSA). Inactive free PSA (f-PSA) represents around 10-40% of the immunologically detectable PSA. The total amount of immunoreactive PSA is known as total PSA (t-PSA). PSA complexed with  $\alpha$ -2-macroglobulin cannot be detected by immunological assays and is therefore frequently called occult PSA (o-PSA).

Current methods of screening men for prostate cancer utilize the detection of t-PSA. Levels of 4.0 ng/ml or higher

are strong indicators of the possibility of prostatic cancer and are an indication for follow-up examinations of the patient. However, elevated serum PSA levels are frequently also attributed to benign prostatic hyperplasia, leading to a high percentage of false positive screening results. A potential solution to this problem involves the determination of free PSA levels. Studies have suggested that the percentage of free PSA is lower in patients with prostate cancer than those with benign prostatic hyperplasia. Thus, the measurement of free serum PSA in conjunction with total PSA, can improve specificity of prostate cancer screening in selected men with elevated total serum PSA levels, which would subsequently reduce unnecessary prostate biopsies with minimal effects on cancer detection rates.

### 2. PRINCIPLE

This f-PSA ELISA is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The microtiter wells are coated with an anti-f-PSA monoclonal antibody, directed towards an epitope of an antigen molecule. An aliquot of patient serum is incubated in the coated well with enzyme conjugated second antibody (E-Ab), directed towards a different region of the antigen molecule. After incubation the unbound E-Ab is washed off. The amount of bound E-Ab is proportional to the concentration of antigen in the sample. After adding the substrate solution, the intensity of colour developed is proportional to the antigen concentration in the sample. The measured ODs of the Calibrators are used to construct a calibration curve against which the unknown samples are calculated.

### 3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

#### 3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. PSA Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)  
CAL0 / Sample Diluent (10 mL) **REF DCE002/13806-0**  
CAL1 **REF DCE002/13807-0**  
CAL2 **REF DCE002/13808-0**  
CAL3 **REF DCE002/13809-0**  
CAL4 **REF DCE002/13810-0**  
CAL5 **REF DCE002/13811-0**

Contain non-mercury preservative.

2. Controls (2 vial, 0.5 mL each)  
Low Control **REF DCE045/13804-0**  
High Control **REF DCE045/13805-0**

For concentration see the Certificate of Analysis.  
Contains non-mercury preservative.

3. Coated Microplate (1 breakable microplate)  
Monoclonal antibody anti PSA adsorbed on microplate  
**REF DCE002/13803-0**

4. Assay Reagent (1 vial, 6 mL)  
Contains non-mercury preservative  
**REF DCE043/13843-0**

5. Enzyme Conjugate (1 vial, 6 mL)  
Monoclonal antibody anti PSA conjugated to horseradish peroxidase. Contains non-mercury preservative.  
**REF DCE002/13802-0**

6. 40X Wash Buffer (1 vial, 25 mL)  
Dilute with distilled water before use.  
**REF DCE057/13857-0**

7. TMB Substrate (1 vial, 12 mL)  
Contains TMB (tetramethylbenzidine) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**REF DCE004/13804-0**

8. Stop Solution (1 vial, 14 mL)  
Contains sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.5M (avoid contact with the Stop Solution, it may cause skin irritations and burns)  
**REF DCE005/13805-0**

#### 3.2. Material required but not provided

- Precision micropipettes (volume: 25 µL and 100 µL) with disposable tips
- Distilled water
- ELISA photometer with 450 nm- and 630 nm-filters
- Timer with 60 min. range or higher
- Microplate washer (optional)
- Vortex or similar mixing tools
- Container for the proper handling of waste and samples after use

#### 4. STORAGE AND STABILITY

- Store the kit and components at +2 °C to + 8 °C
- Bring to room temperature (18-25°C) at least 30 minutes before use. After use put back into the refrigerator. Avoid long time storage at room temperature.
- Do not use the kit or components after the expiry date. For expiry date of the original packed kit see kit label.
- Close the bottles immediately after use.
- Store the plate incl. desiccant in the provided zip-lock pouch. Modules that are not used should always be stored under this condition.
- Ensure that kit components do not freeze.
- Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

### 5. PRECAUTIONS

- ELISA kits are only for in vitro diagnostic use by professionals.
- Serum and plasma samples should be treated as potentially infectious materials. Wear gloves and proper laboratory attire when handling sample materials. Do not eat, drink or smoke in areas where specimen or kit reagents are handled. Do not pipette with the mouth. In case of skin contact, wash with a germicidal soap and copious amounts of water. Seek medical advice if indicated.
- The PSA Calibrators and Controls are of human origin. They have been tested and confirmed negative for HIV, HBsAg and HCV. However, all Calibrators should be treated as potential biohazards.
- Due to the potentially infectious character of samples and kit components all materials that have come in contact with these materials should be sterilized and disposed of according to local regulations. This also includes the liquid waste.
- The assay reagents contain preservatives, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or sulphuric acid and may be harmful if ingested. A direct skin or mucosa contact should be avoided. In case of skin contact, wash thoroughly with water and seek medical attention if required.
- The stop solution contains H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Since the H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> used to terminate the color reaction is corrosive, the instrumentation employed to dispense it should be thoroughly cleaned after use.
- Do not interchange reagents from different lots or different suppliers.
- Avoid reagent or sample carry-over by using fresh tips for solutions and samples.
- Do not use test kit if zip lock pouch or bottles have been damaged.

### 6. GUIDELINE FOR SAMPLE COLLECTION, PREPARATION AND STORAGE

#### 6.1. Sample collection

Blood samples are collected by veinpuncture. As different factors could influence the PSA level in blood, doctors should ensure that the patient has avoided the following conditions before taking the blood sample.

The following conditions may lead to an increase of PSA levels:

- biking
- sexual intercourse (ejaculation)
- Manipulation of the prostate during medical examinations like DRE, transrectal prostatic ultrasound etc. Please note that especially DRE might lead to an increase of f-PSA only, so that PSA carcinomas might be overlooked
- Prostatitis
- Liver dysfunction

The following conditions may lead to a decrease of PSA levels

- Intake of 5-alpha-reductaseinhibitors, antiandrogens, or GnRH analoga

#### 6.2. Sample preparation

The preparation of serum or plasma samples is performed according to standard techniques. Serum or plasma should be prepared as soon as possible to avoid hemolysis and to improve the stability of PSA.

### 6.3. Storage of samples

For the assay either fresh serum or plasma samples can be used. F-PSA is not as stable as t-PSA.

Literature (Thomas, 2008) recommends to measure samples within 24 hours. In case of longer storage, freeze at -20 °C. A repeated freezing and thawing of samples should be avoided.

#### Note

- Highly lipemic or hemolytic samples can give incorrect analytical results.
- Samples must be free of microbial contaminations.
- Samples containing high titers of rheumatoid factor and human anti-mouse antibodies (HAMA) could give erroneous results.

## 7. ASSAY PROCEDURE

### 7.1. Preparation of the Calibrators (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)

The Calibrators are calibrated against WHO 96/668 and have the following concentrations:

	C <sub>0</sub>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
ng/mL	0	0.75	1.50	3	6	12

Contain a preservative.

### 7.2. Preparation of the Wash Solution

Before starting the assay the wash buffer must be diluted to the right concentration. Per well approximately 2 mL of diluted buffer are needed. Calculate the volume of buffer required for the testing. Take 1/40 of the volume wash buffer concentrate and dilute with 39/40 of the volume distilled water.

### 7.1. Test procedure

Note: It is highly recommended to perform all measurements as duplicates. An independent calibration curve should be made for each series of measurements. For best results it is important that the solutions are always added to the wells in the same order to minimize variations in incubation times.

- Prior to use bring all reagents, Calibrators, controls, and samples to room temperature (18-25°C).
- Check that all components are not expired and take care that bottles and plate (inclusive pouch) are not damaged.
- Format the required microplate wells. Keep in mind that all measurements should be performed as duplicate. Document position of wells and respective samples, Calibrators and controls to ensure later identification. Put any unused microwell modules back into the zip lock bag with the desiccant, seal bag and store at 2-8 °C.
- Samples with an expected f-PSA value higher than 12 ng/mL should be diluted with the sample diluent.

Reagent	Calibrator	Sample	Controls
Calibrators C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	25 µL		
Controls			25 µL
Sample		25 µL	
Assay Reagent	50 µL	50 µL	50 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec). Incubate 1 hour at room temperature (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	50 µL	50 µL	50 µL
Mix by moving plate on the table (10 sec). Incubate 1 hour at room temperature (18-25°C). Remove solution from the wells by aspirating the liquid or by decanting it. If decanting, tap plate on adsorbent paper to remove residual liquid.  For washing fill plate with diluted wash buffer and wait 10sec before removing the buffer; repeat wash 5 times (for a total of 6 times).  We recommend the following procedure: wash wells 6-times with 250-300 µL/well diluted wash buffer. Preferably use an automated washing procedure. If washing manually, take care that the wash buffer remains in each well for the same time. This is necessary to receive lowest possible CV-values.			
Substrate Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 15 minutes at room temperature (18-25°C) in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake the microplate gently. Read absorbencies (OD) at 450 nm (blinking 630nm)			

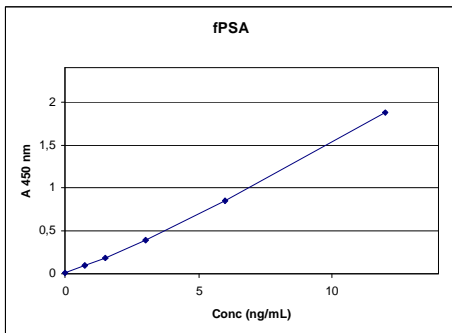
### 7.1. Results

1. Calculate the mean absorbance for each duplicate.
2. Subtract the absorbance value of the Calibrator 0 from the mean absorbance values of Calibrators, control and samples.
3. Draw the calibration curve on lin-lin or log-log graph paper by plotting absorbance values of Calibrators against appropriate PSA concentrations.
4. Read off the f-PSA concentrations for the control and the samples.

## 8. VALIDITY OF THE ASSAY

1. The OD 450 nm of the blanking well is lower than 0.150. Higher values indicate a chromogen/substrate contamination. In such a case, repeat the assay carefully checking the reagent.
2. The OD 450 nm of the highest Calibrator (12 ng/mL) must be higher than 0.9. Lower values indicate kit or control decay. In such a case, check the expiry date of the kit before repeating the assay.
3. The control provided should not differ by more than 15% from the concentration stated on the label of the vial if run at least in duplicate.
4. Worksheet and calibration curve of typical assay: not to be used for calculation of actual test results.

Wells	Identity	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	Cal 0 ng/mL	0.011	0,009	
3-4	Cal 0.75 ng/mL	0.109	0.096	
5-6	Cal 1.5 ng/mL	0.185	0.179	
7-8	Cal 3 ng/mL	0.393	0.392	
9-10	Cal 6 ng/mL	0.871	0.837	
11-12	Cal 12 ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



Note that the absolute OD values for the Calibrators might vary due to temperature influences or age of the conjugate. As long as the OD values form a calibration curve and remain within the specifications and the control shows the expected value, results for unknown PSA samples are valid.

## 9. QUALITY CONTROL

- It is recommended that internal controls are used in every assay.
- Control results should be within established ranges and should represent preferably low, medium and high concentrations.

## 10. EXPECTED VALUES LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

When total PSA values are between 4-10 ng/mL the ratio of f-PSA to t-PSA might be employed to increase the diagnostic specificity of PSA testing. Generally the likeliness of a cancerous condition increases the lower the f-PSA portion is.

A ratio of f-PSA to t-PSA of 25 % usually indicates a high probability of BPH (benign prostate hyperplasia). Low f-PSA likely signals prostate cancer. Most men with prostate cancer have an f- PSA value below 15 %. If free PSA is below 7% prostate cancer is most likely. According to the American Cancer Society and National Cancer Institute men with f-PSA below 7 % should undergo biopsy.

Please note that an isolated f-PSA concentration is of no diagnostic value.

For a detailed discussion of probabilities of prostate cancer and percent free PSA also see Gion et al. (1998).

The above values are only for user's guidance. If possible, it is recommended for each laboratory to establish its own specific values that take into consideration a population indigenous to the area where the laboratory is located.

**Note: PSA values and the f-PSA to t-PSA can only be used to estimate the cancer risk. They should always be interpreted in conjunction with other clinical findings and should not be used as a sole basis for prostate cancer diagnosis.**

## 11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 11.1. Detection limit

The limit of detection for this kit is 0.1 ng/mL.

### 11.2. Precision

Intra- and inter-assay precisions were established by analysing three patient sera of different PSA concentrations.

The results are summarized in Tables 1 and 2.

Table 1) Intra-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Table 2) Inter-assay precision

Patients	Number of replicates	Mean ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

### 11.3. Recovery

Spiked serum samples were prepared by adding aliquots of samples with highly elevated free PSA to normal male serum samples. The recovery of the antigen was in between 91.8 – 116% and in average 102%.

Table 3) Recovery

Sample	Expected value (ng/mL)	Observed value (ng/mL)	Recovery %
1	5.48	5.47	99,8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91.8
2	2.78	2..81	101
	5.57	5.68	102
3	2.74	2.82	103

### 11.4. Hook effect

No hook effect has been noticed with samples up to 5000 ng/mL.

### 11.5. Correlation

The f-PSA ELISA (EIA-4189) was compared to a commercially available and CE marked two step Free PSA Elisa:

$$Y = 0.8922x + 0.11; R^2 = 0.8977$$

In a second study the f-PSA ELISA (EIA-4189) was compared to a second reference f-PSA ELISA:

$$Y = 1.0708 x; R^2 = 0.7969$$



### 11.6. Specificity

The assay is highly specific for free PSA, with a relatively low cross-reactivity to other proteins and polypeptides, lipids or chemotherapeutic agents that might be present in patient samples.

Table 4) Specificity

Antigens	Amount added	Cross reaction
<b>Proteins</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lactalbumin	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Interfering substances</b>		
Bilirubin	0.2 mg/mL	No
Triglyceride	15 mg/mL	No
Hemoglobin*	0.1 mg/ml	No
<b>Chemotherapeutic Agents</b>		No
Cyclophosphamid	800 µg/mL	No
Doxorubicin * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamide	10 µg/mL	No
Methotrexate	50 µg/mL	No

\* at higher concentration hemoglobin results in too high OD values, hemolytic samples should thus be avoided.

## 12. LEGAL ASPECTS

### 12.1. Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact Diametra.

### 12.2. Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 12.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### 12.3. Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 14.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 13. BIBLIOGRAPHY

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostrate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

**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)



DCM138-3  
Ed. 01/2015

## Free PSA

para análisis diagnóstico

Prueba inmunoenzimática para la determinación cuantitativa de la PSA (Prostata Specific Antigen) libre en suero y plasma humano.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$  test

REF DKO138

### USO PREVISTO

El kit Diametra Free PSA ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de la PSA libre (f-PSA) en suero o plasma humano. La cuantificación de los niveles de f-PSA se utiliza generalmente en combinación con la cuantificación de la PSA total (t-PSA) para determinar la relación entre f-PSA / t-PSA. Esta relación contribuye en la estimación del riesgo de un carcinoma prostático y en discriminar los niveles de PSA total elevados causados por condiciones no cancerosas de los causados por condiciones no cancerosas. La determinación de la f-PSA es particularmente indicada en los sujetos con elevadas concentraciones de t-PSA pero negativos al tacto prostático, con el propósito de decidir si es necesaria una segunda biopsia prostática.

### 1. IMPORTANCIA CLINICA

EL cancer de la prostata es el más frecuente tipo de tumor en el hombre y es el segundo causante de mortalidad en el hombre entre los tumores.

Hasta hace poco el tacto rectal ha sido utilizado como única modalidad de diagnóstico del tumor prostático en la fase inicial. En los últimos años la determinación de los niveles séricos del PSA se convirtió la metodología mas aceptada para mejorar la especificidad diagnostica del tacto rectal. Aun siendo una proteína tejido especifica y no solamente tumor especifica el PSA se ha convertido en el marcador más importante del carcinoma prostático, demostrando una especificidad mejor de otros marcadores bioquímicos utilizados en este contexto (PAP, fosfatasas alcalina total, CEA, etc.)

En el 1979, Wang et al. Aislaron un antígeno específico y lo llamaron PSA. El PSA es una serina-proteasa de 33kDa. Como quedó demostrado por estudios inmunohistológicos el PSA se localiza en el citoplasma de las células prostáticas, en el epitelio del ducto y en la secreción de la lamina ductal, todos tejidos normales de la próstata así como en los tejidos hiperplásicos benignos o malignos y en el cáncer metastáticos. Si la integridad estructural de la próstata se altera y/o las dimensiones de la glándula aumentan, la cantidad de PSA circulante se puede elevar. En la circulación sanguínea la mayor parte de la PSA forma complejos con inhibidores de las proteinasas. Solo una pequeña fracción de la PSA circula como PSA libre inactiva. Fundamentalmente se pueden distinguir tres principales formas de PSA, dos de las cuales son inmuno reactivas: la forma predominante es un complejo con la  $\alpha_1$ -antiquimiotripsina (ACT-PSA) y la PSA libre que representa entre el 10-40% de la PSA inmunológicamente detectable. La cantidad total de la PSA inmunoreactiva se conoce como PSA total (t-PSA).

La PSA unida a la  $\alpha_2$ -macroglobulina no puede ser detectada por los análisis inmunológicos y por lo tanto se le llama frecuentemente PSA oculta (o-PSA). Las metodologías actuales de tamizaje del cáncer prostático utilizan la detección de la t-PSA, niveles de 4,0ng/mL o mayores son fuertes indicadores de la probabilidad de un carcinoma prostático y dirigen hacia otros exámenes clínicos de seguimiento. Elevados niveles séricos de PSA pueden ser también causados por hiperplasias benignas que provocan un elevado porcentaje de falsos positivos en los procedimientos de tamizaje. Una posible solución a este problema implica la determinación de los niveles de PSA libre. Algunos estudios sugirieron que los niveles de PSA libre son mas bajos en los pacientes con cáncer prostático de los niveles en pacientes con hiperplasia prostática benigna. Por lo tanto la medición de la PSA libre en conjunto con la PSA total puede mejorar la especificidad del tamizaje del cáncer de la próstata en los hombres con elevados niveles de PSA total, lo cual permitiría reducir el número de biopsias prostáticas innecesarias con efectos mínimos sobre la tasa de incidencia del cáncer.

### 2. PRINCIPIO DEL METODO

Este kit es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), los pozos de la microplaca son revestidos con un anticuerpo monoclonal anti f-PSA dirigidos contra un epitopo de la molécula antigenica. Una alícuota del suero del paciente se incuba en los pozos junto a un segundo anticuerpo conjugado a una enzima (E-Ab) dirigido hacia otra región de la molécula de f-PSA. Después de la incubación la fracción E-Ab no ligada se lava y la cantidad de E-Ab ligada es proporcional a la concentración sérica del f-PSA. Después de añadirse la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es proporcional a la concentración de f-PSA presente en la muestra. Las densidades ópticas de los Calibradores se utilizan para trazar una curva de calibración contra la cual se calculan las concentraciones de las muestras.



### 3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACION

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

1. PSA Calibradores (6 frascos, 0.5 mL cada uno)  
CAL0/diluyente de muestra(10 mL) **REF DCE002/13806-0**  
CAL1 **REF DCE002/13807-0**  
CAL2 **REF DCE002/13808-0**  
CAL3 **REF DCE002/13809-0**  
CAL4 **REF DCE002/13810-0**  
CAL5 **REF DCE002/13811-0**

Contienen conservante sin mercurio.

2. Controls (2 frascos, 0.5 mL cada uno)  
Low Control **REF DCE045/13804-0**  
High Control **REF DCE045/13805-0**

La concentración se indica en la hoja de control.  
Contienen conservante sin mercurio.

3. Microplaca Revestida (1 microplaca)  
Anticuerpo monoclonal anti PSA absorbido en la microplaca  
**REF DCE002/13803-0**

4. Reactivo de ensayo (1 frasco, 6 mL)  
Contienen conservante sin mercurio.  
**REF DCE043/13843-0**

5. Enzyme Conjugado (1 frasco, 6 mL)  
Anticuerpo anti PSA conjugado con peroxidasa de rábano (HRP). Contienen conservante sin mercurio.  
**REF DCE002/13802-0**

6. 40X Solución de lavado (1 frasco, 25 mL)  
Diluir con agua destilada ante de usarse.  
**REF DCE057/13857-0**

7. Sustrato Solution (1 frasco, 12 mL)  
Contiene TMB (tetramethylbenzidine) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
**REF DCE004/13804-0**

8. Solución de Parada (1 frasco, 14 mL)  
Contiene ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (evitar el contacto, puede causar irritación y quemaduras)  
**REF DCE005/13805-0**

#### 3.2. Reactivos necesarios no incluidos en el Kit

- Agua destilada.
- Pipetas automáticas (volumén: 25 µL e 100 µL) con puntas desechables.
- Lector ELISA con filtros de 450 nm y 630 nm.
- Cronometro.
- Lavador microplacas (opcional).
- Vortex o instrumento para mezclar.
- Contenedor para el correcto manejo de los desechos.

#### 4. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- Almacenar el Kit y sus componentes a 2-8°C.
- Llevar a temperatura ambiente (18-25°C) el kit por lo menos 30 minutos antes de usarse. Después del uso volver a refrigerar. Evitar exponer el kit a temperatura ambiente por periodos largos.
- No usar el kit o sus componentes después de la fecha de vencimiento indicada en la etiqueta de la caja.
- Después de su uso cerrar correctamente los viales.
- Conservar la microplaca y su desecante en la bolsa (zip-lock). Los pozos no utilizados deberán conservarse siempre en las condiciones descritas.
- Asegurarse que los componentes del kit no se congelen.
- Una vez abierto el kit es funcional durante dos meses si almacenado a la temperatura indicada.

### 5. PRECAUCIONES

- Los Kits ELISA son diseñados solamente para usarse en el diagnóstico in vitro por parte de profesionales en el área de la diagnóstica.
- Las muestras de suero y/o plasma humano deben ser tratadas como potencialmente infectocontagiosas. Utilizar guantes. No comer, beber o fumar en las áreas del laboratorio en las cuales se manejan los kits. No pipetear con la boca, en caso de contacto con la piel lavar con un jabón germicida y abundante agua, consultar un médico si fuera necesario.
- Sea los Calibradores que los controles de este kit son de origen humana. Han sido probados y confirmados negativos para HIV, HBsAg y HCV. De toda forma deben ser manejados como materiales potencialmente infectocontagiosos.
- Debido al carácter potencialmente infeccioso de las muestra y de los componentes del kit, todos los desechos deberán manejarse según la normativa que la autoridad sanitaria local disponga al respecto.
- Los reactivos de kit contienen conservantes, TMB, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ácido sulfúrico y pueden ser dañinos si ingeridos. Evitarse el contacto directo con la piel, en caso de contacto lavase con abundante agua de ser necesario consulte su médico
- La solución de parada contiene H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sustancia corrosiva, por lo tanto es conveniente limpiar la instrumentación utilizada para la dispensación.
- No intercambiar los reactivos de lotes o proveedores distintos.
- Úsese únicamente puntas desechables para evitar contaminaciones.
- No utilice el kit si la confección de la microplaca o de los viales luzcan dañados.

### 6. GUIA PARA LA EXTRACCION, PREPARACION Y CONSERVACION DE LAS MUESTRAS.

#### 6.1. Extracción de la muestra

Las muestra de sangre se extraen por punción venosa, debido a que los niveles de PSA se ven afectados por una variedad de factores, el médico debe asegurarse que el paciente observe ciertas indicaciones antes del muestreo. Las siguientes condiciones pueden alterar los reales niveles de PSA aumentándolos:

- Ciclismo
- Sexo (eyaculación)
- Tacto prostático, ecografía prostática transrectal, etc.
- Prostatitis
- Disfunción hepática.

Las siguientes condiciones pueden alterar los reales valores de PSA disminuyéndolos:

- Terapia con inhibidores de la 5-alfa-reductasa, anti andrógenos o bien análogos de la GnRH

#### 6.2. Preparación de la muestra

La preparación de las muestras séricas o plasmáticas se realiza según la técnica estándar por centrifugación, la separación de la muestra debe realizarse a la brevedad para evitar hemolisis y mejorar la estabilidad del PSA.

#### 6.3. Conservación de las muestras

Para la prueba pueden usarse suero o plasma recién extraídos, si la prueba no se realiza inmediatamente las muestras pueden almacenarse a 2-8°C por 1 semana. Si se requiere conservar la muestra por periodos prolongados congelar a -20°C. Evitar congelar y descongelar repetidas veces.

**Nota**

- Las muestras fuertemente lipemicas o hemolíticas pueden producir resultados erróneos.
- Las muestras deben ser exentes de contaminación microbiológica.
- Las muestras con valores elevados de Factor Reumatoide y/o anticuerpos anti-topo pueden producir resultados erróneos.

**7. PROCEDIMIENTO**

**7.1. Preparación de los Calibradores (C<sub>0</sub>...C<sub>5</sub>)**

Los Calibradores han sido calibrados contra el WHO 96/668 y tienen las siguientes concentraciones:

	<b>C<sub>0</sub></b>	<b>C<sub>1</sub></b>	<b>C<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub></b>	<b>C<sub>4</sub></b>	<b>C<sub>5</sub></b>
<b>ng/mL</b>	0	0,75	1,50	3	6	12

Contienen conservante.

**7.2. Preparación de la solución de lavado**

Antes de principiar el test diluir la solución de lavado a la concentración correcta, para cada pozo son necesarios más o menos 2 mL de solución de lavado diluida. Calcular el volumen de la solución necesaria para el ensayo, tomar una parte (ejemplo: 1 mL) de solución de lavado concentrada y agregar 39 partes (ejemplo: 39 mL) de agua destilada.

**7.3. Procedimiento**

Nota: se aconseja trabajar en duplicado, en cada medición debería realizarse una curva de calibración. Para obtener mejores resultados y más reproducibles es importante que las soluciones se añadan siempre en el mismo orden.

- Antes del uso llevar todos los reactivos a temperatura ambiente (18-25°C).
- Verificar que ningún componente este vencido o dañado.
- Tomar los pozos necesarios, teniendo presente que las mediciones deberían ser efectuadas en duplicado. Documentar la posición de los Calibradores, controles y muestras y devolver al sobre los pozos sobrantes cerrar bien, controlar que el desecante este en el sobre y almacenar a 2-8°C.
- Las muestras con un valor de f-PSA superior de 12ng/mL deben ser diluidas don el diluyente de muestra.

<b>Reactivos</b>	<b>Calibrador</b>	<b>Muestra</b>	<b>Control</b>
Calibrador C <sub>0</sub> -C <sub>5</sub>	<b>25 µL</b>		
Control			<b>25 µL</b>
Muestra		<b>25 µL</b>	
Reactivo de ensayo	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>
Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C).			
Enzyme Conjugate	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>	<b>50 µL</b>
Mezclar bien agitando con movimientos rotativos la placa sobre la mesa de trabajo. (10 sec). Incubar 1 hora a temperatura ambiente (18-25°C). Descartar la solución de los pozos por aspiración o decantación; si utiliza la decantación remover el remanente de líquido del pozo golpeando la placa sobre una servilleta. Lavar lenando los pozos con solución de lavado diluyda durante 10 segundos y luego descartar, repetir el lavado 5 veces (por un total de 6 veces) <u>Procedimiento recomendado:</u> lavar los pozos 6 veces con 250-300µL de solución de lavado diluida, preferiblemente utilice un lavador automático. Si lava manualmente cuide de dejar la solución de lavado el mismo tiempo en cada pozo esto para minimizar el coeficiente de variación.			
Sustrato Solution	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Incube 15 minutos a temperatura ambiente (18-25°C) en oscura.			
Solución de parada	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>	<b>100 µL</b>
Agite delicadamente la microplaca. Leer la absorbancia (OD) a 450 nm (contra referencia a 630nm)			

**Resultados:**

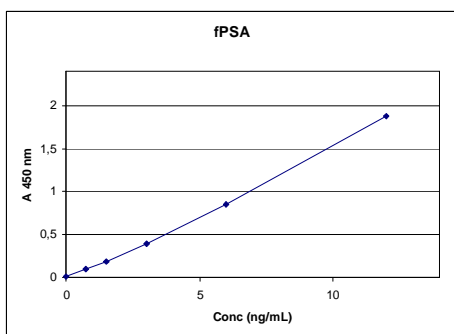
1. Calcular la absorbancia promedio de cada duplicado.
2. Restar el valor de absorbancia del Calibrador cero de las absorbancia de los Calibradores, controles y muestras.
3. Plotear la curva de los Calibradores en papel Linear-Linear o Log-Log (ABS versus Concentración), si dispone de un software de interpretación en el lector ELISA utilícelo.
4. Interpolan los valores de absorbancia en el grafico y calcular las concentraciones de los controles y las muestras.

**8. Validación de la prueba**

1. La absorbancia del Calibrador 0 a 450nm debe ser menor a 0.150, valores superiores indican una contaminación cromógeno/sustrato. En este caso repetir la prueba controlando el reactivo.
2. La absorbancia del Calibrador 12 ng/mL a 450nm debe ser superior a 0.900. Valores menores indican decaimiento del kit. Controlar la fecha de vencimiento del kit antes de repetir la prueba.
3. EL suero control incluido en el kit no debe variar más del 15% de la concentración declarada en la etiqueta, si se trabajó por lo menos en duplicado

4. Hoja de trabajo y curva de calibración de una corrida típica (no se utilice para el cálculo de muestras reales):

Pozo	Contenido	A 450 nm		Conc. ng/mL
1-2	St 0.00ng/mL	0.011	0.009	
3-4	St 0.75ng/mL	0.109	0.096	
5-6	St 1.5ng/mL	0.185	0.179	
7-8	St 3.0ng/mL	0.393	0.392	
9-10	St 6.0ng/mL	0.871	0.837	
11-12	St 12.0ng/mL	1.901	1.844	
13-14	Control	0.218	0.231	2.05



Nótese que los valores absolutos de absorbancia para los Calibradores pueden variar debido a cambios de temperatura y por el envejecimiento del conjugado. Los resultados de PSA de las muestras son validos mientras los valores de absorbancia de los Calibradores cumplan con los intervalos permitidos y las concentraciones de los sueros controles cumplan con los rangos esperados.

## 9. CONTROL DE CALIDAD

- Se recomienda que los controles internos se utilicen en duplicado en cada análisis.
- Los resultados obtenidos deben estar en el rango permitido. Es recomendable utilizar controles en los niveles bajos, medianos y altos.

## 10. VALORES ESPERADOS Y LIMITACIONES DEL TEST

Con valores de PSA total entr 4-10ng/ml la relación entre f-PSA/t-PSA se puede utilizar para aumentar la especificidad diagnostica del test de la PSA. Generalmente la probabilidad de un cáncer prostático aumenta con la disminución de la porción de la f-PSA. Una relación de f-PSA/t-PSA del 25% indica por lo general una elevada probabilidad de hiperplasia prostática benigna, un valor bajo de f-PSA por el contrario indica un probable carcinoma prostático. La mayor parte de hombres con cáncer prostático diagnosticado tiene un valor de f-PSA inferior al 15%. Si la f-PSA es inferior al 7% de la t-PSA el cáncer es más probable aun. Según la American Cancer Society e il National Cancer Institute, hombres con valore de f-PSA del 7% o menos deben ser sometidos a biopsia.

Notese que un valor aislado de concentración de f-PSA no tiene ningún valor diagnostico.

Para una relación detallada acerca de las probabilidades de cancer prostaticos y porcentaje de f-PSA ver Gion et al. (1998)

Los valores arriba reportados son solo una guía para el usuario, de ser posible es aconsejable que el laboratorio fije sus límites dependiendo de los factores locales.

**Nota: los valores de PSA y la relación f-PSA / t-PSA pueden utilizarse únicamente para estimar el riesgo de cáncer. Se deben siempre interpretar en combinación con otros resultados clínicos y nunca se deben utilizar como único diagnostico del carcinoma prostático.**

## 11. PRESTACIONES CARACTERISTICAS

### 11.1. Limite de detección

El limite de detección de este kit es: 0.1 ng/mL.

### 11.2. Precisión

La precisión inter y entre ensayo ha sido establecida utilizando tres sueros de pacientes con diferentes concentraciones de PSA, los resultados se resumen en las tablas 1 y 2.

Tabla 1) Inter ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	0.31	0.024	7.7
2	10	1.75	0.107	6.1
3	10	9.63	0.623	6.5

Tabla 2) entre ensayo

Paciente	N. de replicados	Media ng/mL	SD ng/mL	CV %
1	10	2.86	0.17	6.1
2	10	0.75	0.06	7.8
3	10	2.1	0.16	7.8

### 11.3. Recuperación

Se prepararon muestras específicas enriqueciendo muestras de hombres saludables con alícuotas de muestras con valores elevados de f-PSA, la recuperación del antígeno esta en el rango del 91.8% al 116% con una media del 102%.

Tabla 3) Recuperación

Muestra	Valor esperado (ng/mL)	Valor observado (ng/mL)	Recuperación %
1	5.48	5.47	99.8
	2.74	3.19	116
	5.48	5.03	91.8
2	2.78	2.81	101
	5.57	5.68	102
3	2.74	2.82	103

### 11.4. Efecto Hook

No ha sido observado efecto hook con muestras con concentraciones hasta 5000ng/mL.

### 11.5. Correlación

El kit Diametra Free PSA ELISA ha sido comparado contra un kit comercialmente disponible y marcado CE:

$$Y = 0.8922 * X + 0.11; R^2 = 0.8977$$

En un segundo estudio el kit Diametra Free PSA ELISA ha sido comparado contra otro kit:

$$Y = 1.0708 * X; R^2 = 0.7969$$

### 11.6. Especificidad

El ensayo es altamente específico para la f-PSA, con reacciones cruzadas relativamente bajas para otras proteínas, polipeptidos, lípidos o agentes quimioterápicos que pueden estar presentes en los sueros de los pacientes.

Tabla 4) Especificidad

Antígenos	Cantidad añadida	Reacción Cruzada
<b>Proteínas</b>		
AFP	10 µg/mL	No
CEA	10 µg/mL	No
HCG	10 µg/mL	No
Lattoalbumina	10 µg/mL	No
PAP	1 µg/mL	No
<b>Sustancias Interferentes</b>		
Bilirrubina	0.2 mg/mL	No
Triglicéridos	15 mg/mL	No
Hemoglobina*	0.1 mg/ml	No
<b>Agentes quimioterápicos</b>		
Ciclofosfamida	800 µg/mL	No
Doxorubicina * HCl	20 µg/mL	No
Diethylstilbestrol	2 µg/mL	No
Flutamida	10 µg/mL	No
Metotrexato	50 µg/mL	No

\* a valores más altos la hemoglobina produce absorbancias elevadas, por lo tanto los sueros hemolizados deberían ser descartados

## 12. ASPECTOS LEGALES

### 12.1. Fiabilidad de los resultados

El test se debe realizar siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante. Además el usuario debe respetar las normas GLP (Buenas prácticas de laboratorio) y/o otras normas nacionales así como las leyes vigentes. Esto es particularmente relevante para el uso de reactivos de control. Durante el procedimiento es importante incluir siempre un número suficiente de controles para validar el funcionamiento del test.

Los resultados del test son válidos si todos los controles están en el rango especificado, además se deben revisar que los demás parámetros de prueba cumplan con las especificaciones del ensayo. En caso de dudas contacten Diametra.

### 12.2. Decisiones terapéuticas

Las decisiones terapéuticas jamás deben basarse únicamente sobre los resultados de laboratorio, aun si todos los resultados cumplen con lo especificado en el punto 12.1. El resultado del laboratorio es solamente una

parte del cuadro clínico general del paciente. Únicamente en los casos en los cuales los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente deben tomarse decisiones terapéuticas. El resultado del test por sí solo no es factor determinante para decidir tratamientos terapéuticos.

### 12.3. Responsabilidad

Cualquiera modificación del Kit y/o el intercambio o mezcla de componentes de lotes distintos de un kit a otro pueden modificar los resultados esperados y la validez en general del ensayo. Tales modificaciones y/o intercambio anulan cualquier solicitud de sustitución y/o reposición. Los reclamos debidos a una equivocada interpretación de los resultados de laboratorio por parte de los clientes según indicado en el punto 12.2. tampoco son válidos. Independientemente de lo anterior en caso de cualquier reclamo, la responsabilidad del fabricante no supera el valor del kit. Daños provocados al kit durante el transporte no son responsabilidad del fabricante.

## 13. BIBLIOGRAFIA

1. Fritsche HA und RJ. Babalan Clin Chem (1993) Vol: 39: 1529-1529 Analytical performance goals for measuring prostate-specific antigen:
2. Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaft (AWMF): Leitlinien der Deutschen Urologen: PSA-Bestimmung in der Prostatakarzinomdiagnostik (2003) <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/uro1-36v.htm> (Stand Juli 2003)
3. Hammerer P. and Huland H., Der Onkologe (1996), Vol 2: 218-223 Früherkennung des Prostatakarzinoms. Onkologe
4. Milford Ward A. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 633-651 Prostate specific antigen: biology, biochemistry and available commercial assays.
5. Price C. P. et al., Ann Clin Biochem (2001), Vol 38: 188-216 Pre-and post-analytical factors that may influence use of serum prostate specific antigen and its isoforms in a screening programme for prostate cancer.
6. Lange P et al., J Urol (1989) Vol 141:873 The value of serum prostate-specific antigen determinations before and after radical prostatectomy,
7. Akdas et al. British J Uro (1997) Vol 79: 920-923 The role of free prostate specific antigen in the diagnosis of prostate cancer
8. Thomas L (2008) Labor und Diagnose, TH-Books Verlagsgesellschaft 1342-1351
9. Gion M et al. (1998) Clin Chem 44: 2462-2470 Percent free prostate specific antigen in assessing the probability of prostate cancer under optimal analytical conditions

Ed. 01/2015

DCM138-3

**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