



Instructions for Use

Estriol Total ELISA

IVD



REF EIA-3717

Σ 96



DRG

DRG Instruments GmbH, Germany
Frauenbergstraße. 18, D-35039 Marburg
Phone: +49 (0)6421-1700 0, Fax: +49 (0)6421-1700 50
Website: www.drg-diagnostics.de
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG

DRG International, Inc., USA
841 Mountain Ave., Springfield, NJ 07081
Phone: (973) 564-7555, Fax: (973) 564-7556
Website: www.drg-international.com
E-mail: corp@drg-international.com

**Please use only the valid version of the Instructions for Use provided with the kit.
Verwenden Sie nur die jeweils gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung.
Si prega di usare la versione valida delle istruzioni per l'uso a disposizione con il kit.
Por favor, se usa solo la version valida de la metodico técnico incluido aqui en el kit.**

Table of Contents / Tabella die Contenuti

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

1 INTENDED USE

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

Total Estriol ELISA is intended for laboratory use only.

1.1 Clinical Significance

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

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

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

If levels are abnormally low in a pregnant woman, this may indicate a problem with the development in the child.

Levels of estriol in non-pregnant women do not change much after menopause, and levels are not significantly different from levels in men.

2 PRINCIPLE

Total Estriol (antigen) in the sample competes with the antigenic estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti estriol coated on the microplate (solid phase). After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H_2O_2) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H_2SO_4) is added.

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

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

3 REAGENT, MATERIAL AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit

1. Total Estriol **Standards** S0 - S4 (5 vials, 1 mL each)
2. Total Estriol **Controls** (2 vials, 1 mL each);
Control A and Control B;
Concentration of controls are indicated on the Certificate of Analysis
3. **Enzyme Conjugate** (1 vial, 22 mL);
Estriol conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
4. **Coated Microplate** (1 breakable microplate);
Anti-Estriol antibody adsorbed on microplate
5. **TMB Substrate Solution** (1 vial, 15 mL);
 H_2O_2 .TMB 0.26 g/L, (avoid any skin contact)
6. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL);
Sulphuric acid 0.15 mol/L, (avoid any skin contact)
7. **Wash Solution**, 10X Conc. (2 vials, 25 mL);
Phosphate buffer 0.2 M pH 7.4

3.2 Reagents necessary not supplied

Distilled water

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser

Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

Note

Store all reagents between 2 °C - 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, it is stable until expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheet from the unused strips.

4 WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- 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 as preservatives. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Total Estriol from 2 ng/mL to 200 ng/mL.
- The clinical significance of Estriol determination can be invalidated if the patient was treated with natural or 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 °C - 8 °C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22 °C - 28 °C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry dates printed on the labels of the box and of the vials must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background.
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 lipaemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6 PROCEDURE

6.1 Preparation of the Standard and Controls

Before using, mix for 2 minutes.

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

	S0	S1	S2	S3	S4
ng/mL	0	2	20	80	200

The Controls are ready to use.

Once opened, Standards and Controls are stable for 6 months at 2 °C - 8 °C.

6.2 Preparation of Wash Solution

Dilute the content of each vial of the "Wash Solution 10X Conc." 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 °C - 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 determination of total Estriol should be performed in human serum or plasma

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

Avoid repetitive freezing and thawing of samples.

6.4 Procedure

Allow all reagents to reach room temperature (22 °C - 28 °C) for at least 30 minutes.

At the end of the assay, store immediately the reagents at 2 °C - 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 °C - 8 °C.

To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.

As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (S0 - S4), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample / Control	Blank
Sample / Control		20 µL	
Calibrator C ₀ -C ₄	20 µL		
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubate at 37 °C for 1 hour. Remove the content from each well; wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at 22 °C - 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 Total Estriol for monitoring assay performance. These controls should be treated as unknowns and values determined in every test procedure performed. Quality control charts should be maintained to follow the performance of the supplied reagents. Pertinent statistical methods should be employed to ascertain trends. The individual laboratory should set acceptable assay performance limits. Other parameters that should be monitored include the 80, 50 and 20% intercepts of the standard curve for run-to-run reproducibility. In addition, maximum absorbance should be consistent with past experience. Significant deviation from established performance can indicate unnoticed change in experimental conditions or degradation of kit reagents. Fresh reagents should be used to determine the reason for the variations.

8 RESULTS

8.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbances (Em) for each point of the standard curve (S0 - S4) and of each sample

8.2 Standard Curve

Plot the values of absorbance (Em) of the standards (S1 - S4) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (e.g: Four Parameter Logistic).

8.3 Calculation of Results

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

9 REFERENCE VALUE

Serum concentrations of Estriol are included in the following ranges:

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

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 sera in one assay. The within assay variability is $\leq 9.9\%$.

10.1.2 Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate (10x) the measurement of three different sera in different lots of kit. The between assay variability is $\leq 10.3\%$.

10.2 Accuracy

The recovery of 5.5 - 11 - 22 - 44 ng/mL of Estriol gave an average value (\pm SD) of $103.02\% \pm 4.45\%$ with reference to the original concentrations.

The dilution test performed on three sera diluted 2 and 4 times gave an average value (\pm SD) of $107.86\% \pm 3.50\%$

10.3 Sensitivity

The lowest detectable concentration of Total Estriol that can be distinguished from the Standard 0 is 1.05 ng/mL at the 95% confidence limit.

10.4 Specificity: cross reagent

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

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

10.5 Specificity: interfering substances

Interference by Bilirubin (conjugated and unconjugated), Hemoglobin and Triglycerides has been investigated on Estriol Total ELISA kit:

Substance	Assayed Conc.	Interference
Bilirubin (conjugated)	0.2 mg/mL	No
Bilirubin (unconjugated)	0.2 mg/mL	No
Hemoglobin	2 mg/mL	No
Triglycerides	6 mg/mL	No

No interference has been observed with the substances under investigation; following good laboratory practices, it is anyway advised to avoid to use highly lipaemic or haemolysed samples.

10.6 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
Lithium heparin plasma	No
Sodium heparin plasma	No

No interference has been observed.

10.7 Correlation

The new DRG Estriol Total ELISA kit was compared to the old DRG Estriol Total ELISA kit. 35 serum samples were analysed.

The linear regression curve was calculated:

$$y = 1.02x - 1.88$$

$$r^2 = 0.969$$

11 WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

12 BIBLIOGRAPHY

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

13 TROUBLESHOOTING

ERRORS / POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS

No colorimetric reaction

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed)

too high within-run CV%

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

too high between-run CV %

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

1 DESTINAZIONE D'USO

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

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

1.1 Significato Clinico

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

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

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

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

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

2 PRINCIPIO DEL METODO

L'Estriolo Totale (antigene) presente nel campione, compete con l'antigene marcato con perossidasi di rafano (HRP) nei confronti dell'anticorpo anti-Estriolo adsorbito su micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

L'enzima presente nella frazione legata, catalizza la reazione tra il Substrato (H_2O_2) ed il TMB-Substrate (TMB), sviluppando una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop solution (H_2SO_4).

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

La concentrazione di estriolo totale nel campione è calcolata sulla base di una curva di calibrazione.

3 REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Total Estriol **Standard** S0 – S4, (5 flaconi, 1 mL ciascuno)
2. Total Estriol **Controls** (2 flaconi, 1 mL ciascuno)
Control A, Control B;
La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi.
3. **Enzyme Conjugate** (1 flacone, 22 mL)
Estriolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
4. **Coated Microplate** (1 micropiastra breakable)
Anticorpo anti estriolo adsorbito su micropiastra
5. **TMB-Substrate Solution** (1 flacone, 15 mL)
 H_2O_2 -TMB (0,26 g/L), evitare il contatto con la pelle.
6. **Stop Solution** (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0.15 mol/L, evitare il contatto con la pelle.
7. **Wash Solution**, 10X Conc. (2 flaconi, 25 mL)
Tampone fosfato 0,2 M pH 7,4

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 2 °C - 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.
- 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 come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni dell'Estrilo Totale da 2 ng/mL a 200 ng/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli ematici di Estrilo.

5 PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2 °C - 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 °C - 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 di Calibratori e Controlli

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

	S0	S1	S2	S3	S4
ng/mL	0	2	20	80	200

I Controlli sono pronti all'uso.

Una volta aperti, Calibratori e Controlli sono stabili per 6 mesi a 2 °C - 8 °C.

6.2 Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di "Wash Solution, 10X Conc. " 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 °C - 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 dell'Estriolo totale si effettua su siero o plasma umano.

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

Evitare cicli di congelamento e scongelamento del campione.

6.4 Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22 °C - 28 °C) per almeno 30 minuti.**
- Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2 °C - 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 °C - 8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (S0 - S4), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratori	Campione / Controllo	Bianco
Campione / Controllo		20 µL	
Calibratori C ₀ -C ₄	20 µL		
Conjugate	200 µL	200 µL	
Incubare 1 h a +37 °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 15 minuti a temperatura ambiente (22 °C - 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 Estriolo totale per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente.

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

8 RISULTATI

8.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva standard (S0 -S4) e di ogni campione.

8.2 Curva Standard

Tracciare il grafico dell'assorbanza in funzione delle concentrazioni degli Calibratori (S0 -S4). 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 Estriolo sono comprese nei seguenti intervalli:

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

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

10 PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1 Precisione

10.1.1 Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (16x) la misura di tre differenti sieri. La variabilità intra-assay è $\leq 9,9\%$.

10.1.2 Inter-Assay

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

10.2 Accuratezza

La prova di recupero condotta su tre campioni arricchiti con 5,5 - 11 - 22 - 44 ng/mL di Estriolo, ha dato un valore medio (\pm SD) di $103,02\% \pm 4,45\%$.

La prova di diluizione condotta su tre campioni diluiti 2 e 4 volte ha dato un valore medio (\pm SD) di $107,86\% \pm 3,50\%$.

10.3 Sensibilità

La concentrazione minima di Estriolo totale misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 1,05 ng/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4 Specificità: cross reagenti

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

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

10.5 Specificità: sostanze interferenti

L'interferenza da Bilirubina (coniugata e non coniugata), Emoglobina e Trigliceridi è stata testata con il kit Estriol Total ELISA:

Sostanza	Conc. testata	Interferenza
Bilirubina coniugata	0.2 mg/mL	No
Bilirubina non coniugata	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.

10.6 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.

10.7 Correlazione

Il nuovo kit Estriol Total ELISA è stato comparato con il precedente kit Estriol Total ELISA. Sono stati testati i campioni di siero di 35 soggetti.

La curva di regressione è:

$$y = 1,02 \cdot X - 1,88$$

$$r^2 = 0,969$$

11 DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

I reagenti devono essere smaltiti in accordo con le leggi locali

12 BIBLIOGRAFIA

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

13 SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI

ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI

Nessuna reazione colorimetrica del saggio

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intra-assy elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitäts-kennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico In vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	Numero di Catalogo	Número de catálogo	Référence de catalogue
	Batch code *	Chargencode *	Codice del lotto	Codigo de lote	Numéro de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservacion	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Utilizzare prima del	Establa hasta	Utiliser jusque
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Contenu
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen/Anzahl	Volume/Quantità	Volumen/Número	Volume/Quantité