

Product information

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



User's Manual

Estriol unconjugated ELISA



DE1612



96 wells



Demeditec Diagnostics GmbH
Lise-Meitner-Strasse 2
24145 Kiel – Germany
www.demeditec.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, use sólo la versión válida de las instrucciones de uso que se suministran con el kit.
 Utilisez seulement la version valide des Instructions d'utilisation fournies avec le kit.**

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

1. INTENDED USE	4
2. PRINCIPLE OF THE TEST	4
3. WARNINGS AND PRECAUTIONS	5
4. REAGENTS	6
5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION	7
6. ASSAY PROCEDURE	8
7. EXPECTED NORMAL VALUES	9
8. QUALITY CONTROL	10
9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS	11
10. LIMITATIONS OF USE	12
11. LEGAL ASPECTS	12
12. REFERENCES / LITERATURE	12
1. ZWECKBESTIMMUNG	13
2. TESTPRINZIP	13
3. VORSICHTSMAßNAHMEN	14
4. BESTANDTEILE DES KITS	15
5. PROBENVORBEREITUNG	16
6. TESTDURCHFÜHRUNG	16
7. ERWARTETE WERTE	18
8. QUALITÄTSKONTROLLE	18
9. ASSAY-CHARAKTERISTIKA	19
10. GRENZEN DES TESTS	19
11. RECHTLICHE GRUNDLAGEN	20
12. REFERENZEN / LITERATUR	20
1. DESTINAZIONE D'USO	21
2. PRINCIPIO DEL TEST	21
3. PRECAUZIONI	21
4. COMPONENTI DEL KIT	22
5. CAMPIONI	23
6. ATTUAZIONE DEL TEST	23
7. VALORI NORMALI	25
8. CONTROLLO QUALITÀ	25
9. CARATTERISTICHE DEL TEST	26
10. LIMITAZIONE DEL TEST	26
11. ASPETTI LEGALI	27
12. BIBLIOGRAFIA	27

1. FINALIDAD PREVISTA.....	28
2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO	28
3. PRECAUCIONES.....	28
4. COMPONENTES DEL KIT.....	29
5. MUESTRAS.....	30
6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO	30
7. VALORES ESPERADOS	32
8. CONTROL DE CALIDAD	32
9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	33
10. LIMITACIONES DE USO	33
11. ASPECTOS LEGALES	34
12. REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA.....	34
1. UTILISATION PRÉVUE	35
2. PRINCIPE DU TEST	35
3. PRECAUTIONS D'UTILISATION.....	35
4. COMPOSITION DU KIT	36
5. ECHANTILLON	37
6. RÉALISATION DU TEST	37
7. VALEURS ATTENDUES	39
8. CONTRÔLE DE QUALITÉ	39
9. CARACTERISTIQUES DU TEST	40
10. LIMITES D'UTILISATION.....	40
11. ASPECTS LEGAUX	41
12. REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE	41
SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS	44

1. INTENDED USE

1.1. Intended Use

The **DEMEDIATEC Free Estriol ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro diagnostic* measurement of free estriol (unconjugated estriol) in serum during the second half of pregnancy.

This kit is NOT intended to be used for the risk evaluation of trisomy 21.

1.2. Summary and Explanation

Estriol (E3) is the major estrogen formed by the fetoplacental unit during pregnancy. Unconjugated E3 passes through the placenta into the maternal circulation, where it is rapidly converted into glucuronide and sulfate derivatives to facilitate its excretion. The half-life of estriol in the maternal bloodstream is only 20-30 minutes. Therefore, measurement of E3 offers a convenient and quick evaluation of current fetal status. Plasma estriol levels increase steadily throughout pregnancy and most rapidly during the third trimester (28-40 weeks). A sudden decrease in fetoplacental E3 production will result in a rapid decrease of unconjugated E3 in the maternal serum. There are several potential advantages to measuring unconjugated E3 rather than total serum or urinary E3. Unconjugated estriol levels are free from effects related to maternal renal or hepatic disease, and are not altered by the administration of certain antibiotics. Unconjugated E3 allows better prognosis in diabetic pregnancies - and since no hydrolysis of unconjugated E3 is required, a shorter time to first results.

2. PRINCIPLE OF THE TEST

The DEMEDIATEC Free Estriol ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the **principle of competitive binding**. The microtiter wells are coated with a polyclonal [rabbit] antibody directed towards an antigenic site on the Estriol molecule. Endogenous Estriol of a patient sample competes with an Estriol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Estriol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of colour developed is inversely proportional to the concentration of Estriol in the patient sample.

3. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
- All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
- Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
- The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
- Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
- Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution coloured. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
- Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
- Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
- Allow the reagents to reach room temperature (21 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
- Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
- Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
- Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
- Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
- Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
- All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
- Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
- Avoid contact with *Stop Solution* containing 0.5 M H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.
- Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
- TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
- Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
- For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DEMEDITEC.

4. REAGENTS

4.1. Reagents provided

1. **SORB MT** Microtiterwells, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells; Wells coated with anti-Estriol antibody (polyclonal).
2. **CAL 0 – 5** Standard (Standard 0-5), 6 vials, 1 mL, ready to use;
Concentrations: 0 - 0.3 - 1.2 – 4.0 - 15 - 40 ng/mL
3. **CONTROL low & high** Control Low & High, 2 vials, 1 mL each, ready to use; For control values and ranges please refer to QC-Datasheet. Contain non-mercury preservative.
4. **ENZ CONJ** Enzyme Conjugate, 1 vial, 14 mL, ready to use, Estriol conjugated to horseradish peroxidase; Contains non-mercury preservative.
5. **SUB TMB** Substrate Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, Tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN** Stop Solution, 1 vial, 14 mL, ready to use, contains 0.5 M H₂SO₄.
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
7. **WASH SOLN 40x** Wash Solution, 1 vial, 30 mL (40X concentrated), see „Preparation of Reagents“.

Note: Additional *Standard 0* for sample dilution is available upon request.

4.2. Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm - 630 nm)
- Calibrated variable precision micropipettes.
- Absorbent paper.
- Distilled water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3. Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again. Opened kits retain activity for 8 weeks if stored as described above.

4.4. Reagent Preparation

Bring all reagents and required number of strips to room temperature prior to use.

Wash Solution

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution. Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL deionized water to a final volume of 1200 mL.

The diluted Wash Solution is stable for 1 weeks at room temperature.

4.5. Disposal of the Kit

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet.

4.6. Damaged Test Kits

In case of any severe damage to the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing, at the latest, one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum should be used in this assay.

Note: Samples containing sodium azide should not be used in the assay.

In general it should be avoided to use haemolytic, icteric or lipaemic specimens. For further information refer to chapter "*Interfering Substances*".

5.1. Specimen Collection

Serum:

Collect blood by venipuncture (e.g. Sarstedt Monovette for serum), allow to clot, and separate serum by centrifugation at room temperature. Do not centrifuge before complete clotting has occurred. Patients receiving anticoagulant therapy may require increased clotting time.

5.2. Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up to 19 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

5.3. Specimen Dilution

If in an initial assay, a specimen is found to contain more than the highest standard, the specimens can be diluted with *Standard 0* and reassayed as described in Assay Procedure.

For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

Example:

- a) dilution 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly)
- b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mix thoroughly).

6. ASSAY PROCEDURE

6.1. General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Optical density is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.

6.2. Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **10 µL** of each **Standard, Control** and **samples** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Dispense **100 µL Enzyme Conjugate** into each well. Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
4. Incubate for **60 minutes** at room temperature.
5. Briskly shake out the contents of the wells.
Rinse the wells **4 times** with 400 µL diluted *Wash Solution* per well, if a plate washer is used # - or -
rinse the wells **4 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
Important note: The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
6. Add **100 µL** of **Substrate Solution** to each well.
7. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
8. Stop the enzymatic reaction by adding **100 µL** of **Stop Solution** to each well.
9. Determine the absorbance (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 - 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

6.3. Calculation of Results

1. Calculate the average optical density (OD) values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using semi-logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean OD obtained from each standard against its concentration with OD value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean OD value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4 Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve. Samples with concentrations higher than that of the highest standard have to be further diluted or reported as > 40 ng/mL. For the calculation of the concentrations this dilution factor has to be taken into account.

6.3.1. Example of Typical Standard Curve

The following data is for demonstration only and **cannot** be used in place of data generations at the time of assay.

Standard		Optical Density (450 nm)
Standard 0	(0.0 ng/mL)	1.79
Standard 1	(0.3 ng/mL)	1.48
Standard 2	(1.2 ng/mL)	1.18
Standard 3	(4.0 ng/mL)	0.81
Standard 4	(15.0 ng/mL)	0.52
Standard 5	(40.0 ng/mL)	0.38

7. EXPECTED NORMAL VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should determine its own normal and abnormal values.

7.1. Normal healthy adults

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the DEMEDITEC Free Estriol ELISA the following values are observed:

Population	n	Mean (ng/mL)	Median (ng/mL)	5 th - 95 th Percentile (ng/mL)	2.5 th - 97.5 th Percentile (ng/mL)	Range (min. - max.) (ng/mL)
Males	42	0.359	0.367	0.146 - 0.573	0.077 - 0.878	0.075 - 0.987
Females (not pregnant)	43	0.348	0.286	0.057 - 0.822	0.038 - 1.027	0.009 - 1.307

The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

7.2. Values during pregnancy

(p.m. = post menstruationem)

Week of gestation p.m.	Expected range (ng/mL)
12	0.3 - 1.0
13	0.3 - 1.1
14	0.4 - 1.6
15	1.0 - 4.4
16	1.4 - 6.5
17	1.5 - 6.6
18	1.6 - 8.5
19	1.9 - 11
20	2.1 - 13
21	2.6 - 14

Week of gestation p.m.	Expected range (ng/mL)	Twin pregnancy (ng/mL)
22 - 23	2.7 - 16	3 - 18
24 - 25	2.9 - 17	3 - 20
26 - 27	3.0 - 18	4 - 21
28 - 29	3.2 - 20	4 - 22
30 - 31	3.6 - 22	5 - 25
32 - 33	4.6 - 23	6 - 39
34 - 35	5.1 - 25	7 - 39
36 - 37	7.2 - 29	9 - 38
38 - 39	7.8 - 37	13 - 40
40 - 42	8.0 - 39	---

7.3. Clinical significance

The measurement of Estriol (E3) in body fluids has routinely been used for the monitoring and management of fetal well-being, particularly in the high-risk pregnant patient. The concentration of E3 in plasma increases gradually during the first 20 weeks gestation and more rapidly during the third trimester. Since the ranges for normal and abnormal serum conjugated E3 are wide and overlap considerably, a single E3 determination is of little value. The patient should be monitored frequently to establish any individual trend.

Consistently low levels or a sudden and continual decrease of serum E3 during the third trimester is highly indicative of fetal distress and possibly intrauterine death. When such observations are made, the status of the fetus should be assessed by alternative methods.

Interpretation of serum unconjugated E3 levels should be made in conjunction with other clinical tests or diagnostic procedures such as amniocentesis and ultrasound. Subnormal E3 levels may also be observed in patients being administered certain antibiotics or corticosteroids or in patients with impaired maternal hepatic function.

8. QUALITY CONTROL

Good laboratory practice requires that controls be run with each calibration curve. A statistically significant number of controls should be assayed to establish mean values and acceptable ranges to assure proper performance.

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results. Use controls at both normal and pathological levels.

The controls and the corresponding results of the QC-Laboratory are stated in the QC certificate added to the kit. The values and ranges stated on the QC sheet always refer to the current kit lot and should be used for direct comparison of the results.

It is also recommended to make use of national or international Quality Assessment programs in order to ensure the accuracy of the results.

Employ appropriate statistical methods for analysing control values and trends. If the results of the assay do not fit to the established acceptable ranges of control materials patient results should be considered invalid.

In this case, please check the following technical areas: Pipetting and timing devices; photometer, expiration dates of reagents, storage and incubation conditions, aspiration and washing methods.

After checking the above mentioned items without finding any error contact your distributor or DEMEDITEC directly.

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1. Assay Dynamic Range

The range of the assay is between 0.021 ng/mL – 40 ng/mL.

9.2. Specificity of Antibodies (Cross Reactivity)

The following substances were tested for cross reactivity of the assay:

Added steroid	Concentration of steroid	OD 450	Measured concentration
Estriol (E3)	40 ng/mL	0.39	39.67 ng/mL
Testosterone	16 ng/mL	1.758	n.d.
Estradiol (E2)	2 ng/mL	1.579	n.d.
Estrone (E1)	2 ng/mL	1.712	n.d.
Cortisol	800 ng/mL	1.775	n.d.

n.d. = non detectable

9.3. Sensitivity

The analytical sensitivity of the DEMEDITEC ELISA was calculated by subtracting 2 standard deviations from the mean of 20 replicate analyses of the Standard 0 and was found to be 0.021 ng/mL.

9.4. Reproducibility

9.4.1. Intra-Assay

The within-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	20	2.1	4.7
2	20	6.2	3.2
3	20	14.6	3.0

9.4.2. Inter-Assay

The between-assay variability is shown below:

Sample	n	Mean (ng/mL)	CV (%)
1	12	2.1	4.6
2	12	5.7	8.5
3	12	13.3	9.5

9.5. Recovery

Recovery of the DEMEDITEC ELISA was determined by adding increasing amounts of the analyte to three different patient sera containing different amounts of endogenous analyte. Each sample (non-spiked and spiked) was assayed and analyte concentrations of the samples were calculated from the standard curve. The percentage recoveries were determined by comparing expected and measured values of the samples.

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)		1.3	3.6	7.8
Average Recovery		100.8	101.8	106.9
Range of Recovery (%)	from	89.0	92.3	98.5
	to	103.8	109.8	112.3

9.6. Linearity

		Sample 1	Sample 2	Sample 3
Concentration (ng/mL)		2.6	7.2	15.6
Average Recovery		98.2	99.7	100.2
Range of Recovery (%)	from	86.3	90.4	96.4
	to	107.9	106.8	103.7

10. LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

10.1. Interfering Substances

Haemoglobin (up to 4 mg/mL), bilirubin (up to 0.125 mg/mL) and triglyceride (up to 30 mg/mL) have no influence on the assay results.

10.2. Drug Interferences

Until today no substances (drugs) are known to us, which have an influence to the measurement of Estriol in a sample.

10.3. High-Dose-Hook Effect

No hook effect was observed in this test.

11. LEGAL ASPECTS**11.1. 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 DEMEDITEC.

11.2. 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 11.1. 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.

11.3. 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 11.2 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.

12. REFERENCES / LITERATURE

Bashore, R.A., Westlake, J.R. Plasma unconjugated estriol values in high risk pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., June 15, 1977, p371-380

1. ZWECKBESTIMMUNG

Der Demeditec Free Estriol ELISA wird eingesetzt zur quantitativen Bestimmung von freiem Estriol (unkonjugiertem Estriol) in Serum während der zweiten Schwangerschaftshälfte.

Nur für In-vitro Diagnostik.

Dieser Kit ist NICHT für die Risikobewertung von Trisomie 21 vorgesehen.

1.1. Klinische Bedeutung

Estriol bildet den Hauptanteil der durch die fetoplazentale Einheit gebildeten Östrogene. Die Estriolbestimmung dient der Beurteilung der Funktionstüchtigkeit der fetoplazentalen Einheit. Diese kann gestört werden durch eine Verschlechterung der Plazentafunktion oder durch eine Notsituation des Feten. Hauptsymptom einer Funktionseinschränkung der fetoplazentalen Einheit ist die intrauterine Wachstumsretardierung des Feten. Erniedrigte Estriolwerte im Serum oder Urin weisen auf eine intrauterine Wachstumsretardierung hin. Plötzlich abfallende Estriolwerte sind das Symptom einer Notsituation des Feten. Urin- und Serum-Estriolwerte steigen während der Schwangerschaft exponentiell an, die stärkste Zunahme erfolgt nach der 32. Schwangerschaftswoche. Die Streubreite der Estriolwerte gesunder Schwangerer ist groß, die Werte der einzelnen Schwangeren von Tag zu Tag sind jedoch relativ konstant (Schwankung etwa 20 %). Estriolwerte im Referenzbereich sprechen mit einer Wahrscheinlichkeit von über 95 % gegen eine Störung der fetoplazentalen Einheit. Bei einer Risikoschwangerschaft soll etwa ab der 33. Schwangerschaftswoche in ein- bis mehrtägigen Abständen eine Estriolbestimmung erfolgen. Niedrige Werte sprechen bei normalem Aufwärtstrend gegen eine Notsituation des Feten, sind jedoch häufig Anzeichen eines reduzierten fetalen Körpergewichts. Als ungünstig zu beurteilen ist ein Abfallen der Estriolwerte für länger als zwei Tage um 50 % und mehr oder ein Absinken unter die entsprechenden Referenzwertbereiche. Bei der Interpretation niedriger Estriolwerte müssen sowohl rein fetale Ursachen (anenzepale Missbildungen, Mongolismus) als auch plazentale Ursachen (Molenschwangerschaft) bedacht werden.

Hohe Estriolwerte werden bei Zwillingsschwangerschaften gemessen.

2. TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Free Estriol ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Wells der Mikrotiterplatten sind mit einem polyklonalen Antikörper beschichtet, der gegen eine Antikörper-Bindungsstelle des Estriol-Moleküls gerichtet ist. Die Proben werden in die beschichteten Wells gegeben und zusammen mit einem Estriol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estriol aus der Probe mit dem Estriol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen auf den beschichteten Wells. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Wells entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Konzentration an freiem Estriol in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplattenleser gemessen.

3. VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet. Nur für den professionellen Gebrauch.
- Alle Reagenzien dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden durch von der FDA zugelassene Verfahren auf HIV I/II, HBsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Alle Reagenzien sollten jedoch im Gebrauch und bei der Entsorgung als potentielle biologische Gefahrenstoffe behandelt werden.
- Vor Beginn des Tests ist die Gebrauchsanweisung vollständig und sorgfältig zu lesen. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung. Stellen Sie sicher, dass alles verstanden wurde.
- Die Mikrotiterplatte besteht aus einzeln herausnehmbaren und abbrechbaren Streifen. Ungenutzte Vertiefungen müssen bei 2 °C bis 8 °C im verschlossenen Folienbeutel gelagert und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
- Das Pipettieren der Proben und Reagenzien muss so schnell wie möglich und für jeden Schritt in der gleichen Reihenfolge erfolgen.
- Behältnisse jeweils nur für ein einziges Reagenz verwenden. Dies gilt insbesondere für die Substrat-Behälter. Die Verwendung eines Behälters zum Pipettieren der Substratlösung, der zuvor für die Konjugatlösung verwendet wurde, kann zu einer Verfärbung der Lösung führen. Gießen Sie keine Reagenzien zurück in die originalen Fläschchen, da es zu einer Kontamination der Reagenzien kommen kann.
- Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatten-Vertiefungen gründlich, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten-Vertiefungen nicht wiederverwenden.
- Kavitäten während des Assays nicht trocknen lassen; Reagenzien unmittelbar nach Ende des Waschschriffs hinzufügen.
- Lassen Sie die Reagenzien vor Testbeginn Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) erreichen. Die Temperatur wirkt sich auf die Messungen der optischen Dichte des Assays aus. Die Werte für die Patientenproben werden jedoch nicht beeinflusst.
- Niemals mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Reagenzien und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In Bereichen, in denen Proben oder Kit-Reagenzien verwendet werden, darf nicht geraucht, gegessen, getrunken oder Kosmetika aufgetragen werden.
- Beim Umgang mit Proben und Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Eine mikrobielle Kontamination von Reagenzien oder Proben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Die Handhabung sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, die in einer entsprechenden nationalen Richtlinie oder Vorschrift zur Biogefährdung definiert sind.
- Reagenzien nicht über das auf den Kit-Etiketten angegebene Verfallsdatum hinaus verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Volumina müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten aus Kits mit unterschiedlichen Chargennummern dürfen nicht gemischt oder zusammen verwendet werden. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zusammen zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um die gleiche Charge handelt. Die Kits können unter unterschiedlichen Bedingungen versandt oder gelagert worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Kontakt mit der Stopplösung (*Stop Solution*) sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H₂SO₄ enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Einige Reagenzien enthalten ProClin 300, BND und/oder MIT als Konservierungsmittel. Bei Kontakt mit Augen oder Haut sofort mit Wasser spülen.
- TMB-Substrat hat eine reizende Wirkung auf Haut und Schleimhäute. Bei möglichem Kontakt Augen mit reichlich Wasser und Haut mit Seife und reichlich Wasser spülen. Kontaminierte Gegenstände vor der Wiederverwendung waschen. Falls eingeatmet, die Person an die frische Luft bringen.
- Die Reagenzien des Kits sind als gesundheitsgefährdende Abfälle zu betrachten und gemäß den nationalen Vorschriften zu entsorgen
- Informationen zu den im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt. Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4. BESTANDTEILE DES KITS

4.1. Kitinhalt

1. **SORB MT Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar); mit anti-Estriol-Antikörper (polyklonal) beschichtet.
2. **CAL 0 – 5 Standard (Standard 0-5)**, 6 Fläschchen, je 1 mL, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 - 0.3 - 1.2 - 4 - 15 - 40 ng/mL;
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Kontrolle), 2 Fläschchen, 1 mL; gebrauchsfertig; Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Estriol mit Meerrettichperoxidase konjugiert. Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **SUB TMB Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Substratlösung TMB.
6. **STOP SOLN Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig; Enthält 0,5 M H₂SO₄. Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
7. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Waschlösung), **40X** konzentriert, 1 Fläschchen, 30 mL; Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich

4.2. Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm - 630 nm),
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

4.3. Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 8 Wochen ihre Reaktivität.

4.4. Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden.

Wash Solution

Die 40-fach konzentrierte Wash Solution (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen. Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 1 Wochen stabil.

4.5. Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Sicherheitsdatenblatt, Abschnitt 13.

4.6. Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten Sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5. PROBENVORBEREITUNG

Serum sollte n in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

Achtung: Proben, die Natriumazid enthalten, sollten nicht verwendet werden.

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden. Weitere Informationen finden Sie im Kapitel „*Interferenzen*“.

5.1. Probenentnahme

Serum:

Blut durch Venenpunktion entnehmen (z.B. mit Sarstedt Monovette für Serum), gerinnen lassen und das Serum durch Zentrifugation bei Raumtemperatur abtrennen. Vor der Zentrifugation muss die Gerinnung vollständig abgeschlossen sein. Bei Patienten, die Antikoagulantien erhalten, kann die Gerinnungszeit länger dauern.

5.2. Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 19 Monate) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

5.3. Probenverdünnung

Wenn in einem ersten Testdurchlauf bei einer Probe eine Konzentration höher als der höchste Standard gefunden wird, kann diese Probe mit *Standard 0* weiter verdünnt und nochmals bestimmt werden. Die Verdünnung muss jedoch bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel:

a) Verdünnung 1:10: 10 µL Serum + 90 µL *Standard 0* gründlich mischen)

b) Verdünnung 1:100: 10 µL Verdünnung a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (gründlich mischen).

6. TESTDURCHFÜHRUNG

6.1. Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und gut durchmischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe eine neue Plastikspitze verwenden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Wells in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.

6.2. Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. **Je 10 µL Standard, Control und Proben mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. **100 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
4. **60 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln. Wells **4-mal** mit 400 µL verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird
– oder –
Wells **4-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung.
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
Achtung: Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
6. **100 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
7. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **100 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
9. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 - 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der **Stop Solution** bestimmen.

6.3. Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards, Controls und Patientenproben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter-Gleichung bestimmt. (4 Parameter Rodbard oder 4 Parameter Marquardt sind die bevorzugten Methoden.) Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

6.3.1. Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC ELISA gezeigt. Diese Werte sollten **nicht** zur Berechnung von Patientendaten verwendet werden.

Standard		Optische Dichte (450 nm)
Standard 0	(0.0 ng/mL)	1,79
Standard 1	(0.3 ng/mL)	1,48
Standard 2	(1.2 ng/mL)	1,18
Standard 3	(4.0 ng/mL)	0,81
Standard 4	(15.0 ng/mL)	0,52
Standard 5	(40.0 ng/mL)	0,38

7. ERWARTETE WERTE

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

7.1. Gesunde Erwachsene

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem DEMEDITEC Free Estriol ELISA folgende Werte:

Population	n	Mittelwert (ng/mL)	Median (ng/mL)	5. - 95. Perzentile (ng/mL)	2,5. - 97,5. Perzentile (ng/mL)	Bereich (min. - max.) (ng/mL)
Männer	42	0,359	0,367	0,146 - 0,573	0,077 - 0,878	0,075 - 0,987
Frauen (nicht schwanger)	43	0,348	0,286	0,057 - 0,822	0,038 - 1,027	0,009 - 1,307

7.2. Werte in der Schwangerschaft

(p.m. = post menstruationem)

Schwangerschaftswoche p.m.	Erwartete Werte (ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Schwangerschaftswoche p.m.	Erwartete Werte (ng/mL)	Zwillingschwangerschaft (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

ACHTUNG:

Für die klinische Interpretation beachten Sie bitte Kapitel 7. „EXPECTED VALUES“, CLINICAL SIGNIFICANCE in der englischen Version.

8. QUALITÄTSKONTROLLE

Es wird empfohlen, die Kontrollproben gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen einzusetzen. Durch die Verwendung von Kontrollproben wird eine Tag-zu-Tag Überprüfung der Ergebnisse erzielt. Es sollten Kontrollen sowohl mit normalem als auch pathologischem Level eingesetzt werden.

Die Kontrollen mit den entsprechenden Ergebnissen des QC-Labors sind im QC-Zertifikat, das dem Kit beiliegt, aufgeführt. Die im QC-Blatt angegebenen Werte und Bereiche beziehen sich stets auf die aktuelle Kitcharge und sollten zum direkten Vergleich der Ergebnisse verwendet werden.

Es wird ebenfalls empfohlen, an nationalen oder internationalen Qualitätssicherungs-Programmen teilzunehmen, um die Genauigkeit der Ergebnisse zu sichern. Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden. In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode. Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

9. ASSAY-CHARAKTERISTIKA

9.1. Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 0,021 ng/mL – 40 ng/mL.

9.2. Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

9.3. Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des *Standards 0* (n = 20), beträgt 0,021 ng/mL.

Die Daten zu:

9.4. Reproduzierbarkeit (Präzision)

9.5. Wiederfindung

9.6. Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Version der Gebrauchsanweisung.

10. GRENZEN DES TESTS

Zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse werden erzielt, wenn das Testverfahren mit vollständigem Verständnis der Anweisungen in der Gebrauchsanleitung und unter Befolgung der GLP (Good Laboratory Practice)-Richtlinien durchgeführt wird.

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

10.1. Interferenzen

Hämoglobin (bis zu 4 mg/mL), Bilirubin (bis zu 0,125 mg/mL) und Triglyceride (bis zu 30 mg/mL) haben keinen Einfluss auf das Testergebnis.

10.2. Beeinflussung durch Medikamente

Uns sind bislang keine Stoffe (Medikamente) bekannt geworden, deren Einnahme die Messung des Gehaltes an freiem Estriol in der Probe beeinflussen würde.

10.3. High-Dose-Hook Effekt

Ein Hook-Effekt tritt in diesem Test nicht auf.

11. RECHTLICHE GRUNDLAGEN

11.1. Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen. Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

11.2. Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

11.3. Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

12. REFERENZEN / LITERATUR

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1. DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **Demeditec Free Estriol ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa dell'estriolo libero (estriolo non coniugato) nel siero durante la seconda metà della gravidanza.

Questo test kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico.

Questo kit NON è inteso per essere utilizzato per la valutazione del rischio di trisomia 21.

2. PRINCIPIO DEL TEST

Il test **Free Estriol ELISA** è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA), basato sul principio del legame competitivo. I micropozzetti sono ricoperti con un anticorpo policlonale diretto contro un unico sito antigenico della molecola Estriolo. Estriolo endogena di un campione compete con il Estriolo coniugato alla perossidasi di rafano per il sito di legame sull'anticorpo ancorato nel micropozzo. Dopo l'incubazione il coniugato non legato è lavato via.

La quantità della perossidasi coniugata legata è inversamente proporzionale alla concentrazione di Estriolo nel campione. Dopo l'aggiunta della soluzione substrato l'intensità del colore sviluppato è inversamente proporzionale alla concentrazione di Estriolo libero nel campione del paziente.

3. PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0.5 M H₂SO₄. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4. COMPONENTI DEL KIT

4.1. Contenuto del kit

1. **SORB** **MT** **Microtiterwells** (Micropozzetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti
Pozzetti ricoperti con l'anti- Estriolo anticorpo (policlonale)
2. **CAL** **0** – **5** **Standard (Standard 0-5)**, 6 fialoni, 1 mL, pronto all'uso
Concentrazioni: 0 - 0.3 - 1.2 - 4 - 15 - 40 ng/mL
3. **CONTROL** **low** & **high** **Control Low & High** (Controllo), 2 fialoni, 1 mL, pronto all'uso
I valori dei controlli sono indicati sulla descrizione QC. Contiene conservante senza mercurio.
4. **ENZ** **CONJ** **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso
Estriolo coniugato alla perossidasi di rafano. Contiene conservante senza mercurio.
5. **SUB** **TMB** **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso
TMB (benzidine tetrametilico)
6. **STOP** **SOLN** **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 fialone, 14 mL, pronto all'uso;
contiene 0.5M H₂SO₄; Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
7. **WASH** **SOLN** **40x** **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 fialone, 30 mL (concentrata 40X)
vedi „preparazione dei reagenti“

Nota: Ulteriore *Standard 0* per la diluizione dei campioni può essere richiesto alla ditta.

4.2. Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm - 630 nm)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

4.3. Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data. Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere chiusi accuratamente. Test kits aperti rimangono attivi per 8 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

4.4. Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente.

Wash Solution

Diluire 30 mL Wash Solution concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL. La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 1 settimana a temperatura ambiente.

4.5. Smaltimento del kit

Lo smaltimento del kit deve avvenire secondo le regole a norma di legge. Informazioni particolareggiate per questo prodotto si trovano nel regolamento di sicurezza, capitolo 13.

4.6. Test kits danneggiati

Nel caso di gravi danneggiamenti del kit o dei suoi componenti deve avvenire una dichiarazione scritta alla ditta DEMEDITEC, al più tardi una settimana dopo il ricevimento del kit. Componenti danneggiati non dovrebbero essere utilizzati per il test. Questi componenti devono essere magazzinati fino alla soluzione del problema. Dopo di che essi devono essere smaltiti secondo le norme ufficiali.

5. CAMPIONI

Siero può essere usato per questo test.

Attenzione: Se i campioni contengono sodio azide non devono essere utilizzati per questo test.

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici. Per ulteriori informazioni consultare il capitolo "*Sostanze interferenti*".

5.1. Collezione dei campioni

Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente. Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

5.2. Magazzinaggio dei campioni

I campioni dovrebbero essere magazzinati ben chiusi fino a 7 giorni a 2 °C a 8 °C.

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 19 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

5.3. Diluizione dei campioni

Se in un campione di siero viene trovata una concentrazione oltre lo standard più alto, questo campione può essere diluito con lo *Standard 0* e nuovamente determinato.

Della diluizione deve essere però tenuto conto.

Esempio:

- a) diluizione 1:10: 10 µL siero + 90 µL *Standard 0* (agitare bene)
- b) diluizione 1:100: 10 µL della diluizione a) + 90 µL *Standard 0* (agitare bene).

6. ATTUAZIONE DEL TEST

6.1. Indicazioni generali

- Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente e ben mescolati prima dell'uso. Evitare la formazione di schiume.
- Una volta iniziato il procedimento del test, questo deve essere portato alla fine senza interruzione.
- Per ogni componente, standard, controllo o campione è necessario utilizzare una nuova punta monouso per evitare reazioni incrociate.
- La densità ottica dipende dal tempo d'incubazione e dalla temperatura. Perciò si rende necessario di preparare tutti i reagenti, di aprire i tappi dei flaconi e di appostare tutti i pozzetti nelle appropriate posizioni. Soltanto una tale preparazione garantisce gli stessi tempi per ogni processo di pipettamento.
- Come regola generale vale che la reazione enzimatica si svolge linearmente proporzionale con il tempo e con la temperatura.

6.2. Eseguimento del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **10 µL** di ogni **Standard, Control e campione** nei pozzetti, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Pipettare **100 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto. Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
4. Incubare per **60 minuti** a temperatura ambiente.
5. Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti. Lavare i pozzetti **4 volte** con 400 µL *Wash Solution* diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio
- oppure -
lavare i pozzetti **4 volte** con **300 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
Importante: La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguiimento del lavaggio!
6. Aggiungere **100 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
7. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
8. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **100 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
9. Determinare la densità ottica (DO) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 - 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione. Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della *Stop Solution*.

6.3. Rilevamento dei risultati

1. Determinare i valori medi della densità ottica (DO) per ogni set di standard, controlli e campioni.
2. Costruire una curva standard: riportare i valori medi della densità ottica (DO) di ogni standard contro la rispettiva concentrazione dove i valori delle DO si devono trovare sull'asse verticale (Y) e le concentrazioni sull'asse orizzontale (X).
3. Utilizzando il valore medio delle DO per ogni campione si determina la rispettiva concentrazione dalla curva standard.
4. Metodo automatico: I valori riportati in queste istruzioni per l'uso sono stati determinati tramite l'equazione a 4 parametri. (I metodi preferiti sono 4 Parameter Rodbard oppure 4 Parameter Marquardt.) Altri funzioni usati per l'elaborazione dei dati possono dare risultati leggermente differenti.
5. La concentrazione dei campioni può essere determinata direttamente dalla curva standard. Campioni con una concentrazione più elevata dello standard più concentrato devono essere diluiti. Di questo fattore di diluizione deve essere tenuto conto per il calcolo della concentrazione.

6.3.1. Esempio di una curva standard tipica

I seguenti dati sono a scopo dimostrativo soltanto e **non possono** sostituire i dati generati dall'eseguiimento del test.

Standard		Densità ottiche (450 nm)
Standard 0	(0.0 ng/mL)	1,79
Standard 1	(0.3 ng/mL)	1,48
Standard 2	(1.2 ng/mL)	1,18
Standard 3	(4.0 ng/mL)	0,81
Standard 4	(15.0 ng/mL)	0,52
Standard 5	(40.0 ng/mL)	0,38

7. VALORI NORMALI

È consigliabile che ogni laboratorio determini i propri valori normali e anormali.

7.1. Adulti normali sani

In uno studio condotto su persone apparentemente sane usando il test DEMEDITEC Free Estriol ELISA i seguenti valori sono stati ottenuti:

Popolazione	n	Media (ng/mL)	Mediano (ng/mL)	5. - 95. percentile (ng/mL)	2,5. - 97,5. percentile (ng/mL)	Intervallo (min. - max.) (ng/mL)
Uomini	42	0,359	0,367	0,146 - 0,573	0,077 - 0,878	0,075 - 0,987
Donne (non in gravidanza)	43	0,348	0,286	0,057 - 0,822	0,038 - 1,027	0,009 - 1,307

7.2. Livelli normali di Estriol libero nel siero durante la gravidanza

(p.m. = post menstruationem)

Settimana di gravidanza p.m.	Valori aspettati (ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Settimana di gravidanza p.m.	Valori aspettati (ng/mL)	Gravidanza gemellare (Twin pregnancy) (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

ATTENZIONE:

Per interpretazione clinica consultare la metodica in inglese (Capitolo 7. EXPECTED VALUES).

8. CONTROLLO QUALITÀ

È consigliabile utilizzare i campioni controllo secondo le norme di legge. Attraverso l'utilizzo dei campioni controllo si può raggiungere una verifica dei risultati giorno per giorno. Dovrebbero essere adoperati campioni controllo sia con un livello normale sia con uno patologico.

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. È altresì consigliabile di partecipare a programmi di sicurezza sulla qualità nazionali o internazionali, per assicurarsi dell'esattezza dei risultati. Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati dei test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzino e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio. Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DEMEDITEC.

9. CARATTERISTICHE DEL TEST

9.1. Assay Dynamic Range

Le concentrazioni determinabili con questo test stanno tra 0,021 ng/mL – 40 ng/mL.

9.2. Specificità degli anticorpi (reazioni ad incrocio)

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

9.3. Sensitività analitica

La sensitività analitica è stata calcolata dai valori medi meno due deviazioni standard di venti (20) repliche dello *Standard 0* ed erano 0,021 ng/mL.

Dati dettagliati su

9.4. Precisione

9.5. Recupero

9.6. Linearità

si prega di consultare le dettagliate istruzioni per l'uso in inglese.

10. LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP). Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione del protocollo può influenzare i risultati.

10.1. Sostanze interferenti

Emoglobina (fino a 4 mg/mL), bilirubina (fino a 0,125 mg/mL) e trigliceridi (fino a 30 mg/mL) non influenzano i risultati di questo test.

10.2. Droghe interferenti

Fino ad oggi nessuna sostanza (farmaco) è conosciuta a noi che abbia influenzato la determinazione di Estriolo nel campione.

10.3. Effetto Hook di alti dosaggi

Nessun effetto gancio (effetto hook) è stato osservato in questo test.

11. ASPETTI LEGALI

11.1. Affidabilità dei risultati

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test. I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DEMEDITEC.

11.2. Conseguenze terapeutiche

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente. Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche. Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

11.3. Responsabilità legali

Ogni cambiamento del protocollo del test e/o lo scambio o il mescolamento di componenti provenienti da cariche diverse possono influenzare negativamente i risultati e compromettere la validità del test. Questi cambiamenti e/o scambi annullano ogni diritto al risarcimento.

Si respingano inoltre tutti i richiami risultanti da interpretazioni sbagliate da parte dell'utente secondo il paragrafo 11.2. Nel caso di reclamazione, la garanzia del produttore è limitato al valore massimo del test kit. Ogni danno provocato durante il trasporto del kit non sottostà alla responsabilità del produttore.

12. BIBLIOGRAFIA

Per dettagli più precisi consultare la metodica in inglese.

1. FINALIDAD PREVISTA

El Kit de inmunoensayo enzimático Demeditec Free Estriol proporciona los materiales necesarios para la determinación cuantitativa del estriol libre (estriol no conjugado) en suero durante la segunda mitad del embarazo.

Este ensayo está diseñado solo para diagnóstico in vitro.

Este kit NO está diseñado para ser utilizado para la evaluación del riesgo de trisomía 21.

2. FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El Kit **Demeditec Free Estriol ELISA** es un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas (ELISA), basado en el principio de unión competitiva. Los pocillos de las placas están recubiertos con un anticuerpo policlonal dirigido contra un foco antigénico en la molécula Estriol. En las muestras de los pacientes Estriol compite con un conjugado Estriol -peroxidasa de rábano en la unión al anticuerpo inmovilizado. Después de la incubación el conjugado no unido se lava. La cantidad de conjugado de peroxidasa unido es inversamente proporcional a la concentración de Estriol en la muestra. Después de la adición de la solución sustrato, la intensidad de color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de Estriol libre en la muestra del paciente.

3. PRECAUCIONES

- Este kit es solamente para diagnóstico *in vitro*.
- Por favor, se usa solo la versión válida de la metodología técnica incluido aquí en el kit.
- Para obtener información de las sustancias peligrosas incluidas en el kit por favor mirar las hojas de los datos de seguridad del material.
- Todos los reactivos en este kit de ensayo que contienen suero o plasma humano se han ensayado y confirmado ser negativos para HIV I/II, HBsAg y HCV mediante procedimientos aprobados por la FDA. Sin embargo, todos los reactivos deben ser tratados tanto en su uso como dispensación como potencialmente biopeligrosos.
- Evitar contacto con *Stop Solution* que contiene H₂SO₄ 0,5 M. Puede provocar irritación y quemaduras en la piel.
- Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y con membranas mucosas.
- No fumar, comer, beber o usar cosméticos en áreas donde las muestras o los reactivos del kit están siendo usados.
- Usar guantes de látex cuando se utilicen las muestras y los reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o las muestras puede dar resultados erróneos.
- El manejo debe realizarse de acuerdo a los procedimientos definidos por las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- No utilizar los reactivos después de su fecha de caducidad que aparece en las etiquetas del kit.
- Todos los volúmenes indicados han de ser realizados de acuerdo con el protocolo. Los resultados óptimos del ensayo se obtienen solo cuando se utilizan pipetas y lectores de microplacas calibrados.
- No mezclar o usar componentes de kits con distinto número de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso si son del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenados bajo diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar diferentes.
- Los compuestos químicos y los reactivos preparados o utilizados han de tratarse como residuos peligrosos de acuerdo con las guías o regulación nacionales de seguridad de sustancias biopeligrosas.
- Las hojas de los datos de seguridad de este producto están disponibles bajo pedido directamente a DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4. COMPONENTES DEL KIT

4.1. Componentes del Kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Placas multipocillo), 12 x 8 tiras separables, 96 pocillos; Pocillos recubiertos con anticuerpo anti-Estriol (policlonal).
2. **CAL 0 – 5 Standard (Standard 0-5)**, (Estándar), 6 viales, 1 mL, listo para usar; Concentraciones: 0 - 0.3 - 1.2 - 4 - 15 - 40 ng/mL
3. **CONTROL low & high Control Low & High**, 2 viales, 1 mL, listo para usar; Referir los valores y rangos del control a la Hoja de datos QC. Contiene conservante.
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugado enzimático), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Estriol conjugado con la Peroxidasa de rábano; Contiene conservante sin mercurio.
5. **SUB TMB Substrate Solution** (Solución de sustrato), 1 vial, 14 mL, listo para usar, Tetrametilbencidina (TMB).
6. **STOP SOLN Stop Solution** (Solución de parada), 1 vial, 14 mL, listo para usar, contiene 0.5 M H₂SO₄. Evitar el contacto con la Solución de parada. Puede causar irritación y quemaduras en la piel.
7. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solución de lavado), 1 vial, 30 mL (concentrado 40X), ver "Preparación de los Reactivos".

Nota: Se puede solicitar el *Standard 0* para la dilución de la muestra.

4.2. Equipamiento y material requerido pero no provisto

- Lector de microplacas calibrado (450 nm, con longitud de onda de referencia a 620 nm - 630 nm)
- Micropipetas de precisión variable calibradas.
- Papel absorbente.
- Agua destilada.
- Temporizador
- Papel cuadriculado o software para el cálculo de datos

4.3. Almacenamiento y estabilidad del kit

Cuando se almacena a 2 °C - 8 °C, los reactivos sin abrir mantienen su reactividad hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos más allá de esta fecha.

Los reactivos abiertos han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Las placas multipocillo han de almacenarse a 2 °C - 8 °C. Una vez se ha abierto la bolsa hay que tener cuidado y cerrarla de nuevo.

Los kits abiertos conservan su actividad durante 8 semanas si se almacenan como se ha descrito arriba.

4.4. Preparación de los Reactivos

Dejar que todos los reactivos y el número requerido de tiras alcancen la temperatura ambiente antes de usarse.

Wash Solution

Mezclar 30 mL de Wash Solution concentrada con 1170 mL de agua destilada hasta un volumen final de 1200 mL. La solución del lavado diluida es estable durante 1 semana a temperatura ambiente.

4.5. Eliminación del Kit

La eliminación del kit debe realizarse de acuerdo con las leyes nacionales. En las hojas de datos de seguridad se proporciona información especial de este producto (ver capítulo 13).

4.6. Kits de ensayo dañados

En caso de que exista cualquier daño severo del kit de ensayo o de sus componentes, ha de informarse por escrito a DEMEDITEC, no más tarde de una semana después de recibir el kit. No deben utilizarse componentes dañados para llevar a cabo un ensayo. Han de almacenarse hasta que se encuentre una solución. Después de esto, deben ser eliminados de acuerdo con las leyes oficiales.

5. MUESTRAS

En este ensayo pueden usarse suero.

Tener en cuenta: No deben usarse muestras que contengan acida sódica.

En general, se debe evitar el uso de muestras hemolíticas, ictericas o lipémicas. Para más información consulte el capítulo "*Sustancias que pueden interferir*".

5.1. Toma de muestras

Suero:

Recoger la sangre por punción en la vena (ej. Sarstedt Monovette para el suero), permitir coagulación, y separar el suero por centrifugación a temperatura ambiente. No centrifugar antes de la coagulación completa. Las muestras de pacientes que reciben terapia anticoagulante requieren más tiempo para coagular.

5.2. Almacenamiento de las muestras

Las muestras deben ser tapadas y pueden ser almacenadas hasta 7 días a 2 °C a 8 °C antes del ensayo.

Las muestras almacenadas por un período de tiempo mas largo (hasta 19 meses) han de congelarse sólo una vez a -20 °C antes del ensayo. Las muestras descongeladas deben invertirse varias veces antes del ensayo.

5.3. Dilución de las muestras

Si en un ensayo inicial, se encuentra una muestra que presenta valores mayores que el estándar mas concentrado, ha de diluirse con *Standard 0* y volver a ensayarse como se describe en el Procedimiento de Ensayo.

Para el cálculo de las concentraciones habrá que tener en cuenta el factor de dilución.

Ejemplo:

- a) dilución 1:10: 10 µL Suero + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente)
- b) dilución 1:100: 10 µL dilución a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (mezclar totalmente).

6. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

6.1. Consideraciones generales

- Todos los reactivos y muestras han de estar a temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma.
- Una vez se ha comenzado el ensayo deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- Utilizar puntas de pipeta de plástico nuevas para cada estándar, control o muestra para evitar combinaciones cruzadas.
- La absorbancia es función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos estén preparados, tapas removidas, todos los pocillos que se necesiten asegurados en recipiente, etc. Esto asegurará un tiempo similar para cada paso de pipeteo sin que haya interrupciones.
- Como regla general, la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y a la temperatura.

6.2. Procedimiento de ensayo

Cada uno debe incluir una curva de estándares.

1. Asegurar el número deseado de pocillos en el recipiente.
2. Dispensar **10 µL** de cada **Standard, Control y muestras** con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Dispensar **100 µL** de **Enzyme Conjugate** a cada pocillo.
Mezclar totalmente durante 10 segundos. Es importante mezclar completamente en este paso.
4. Incubar durante **60 minutos** a temperatura ambiente.
5. Sacudir energicamente el contenido de los pocillos.
Lavar los pocillos **4 veces** con 400 µL *Wash Solution* diluida por pocillo), si se utiliza un lavador de placas - o - Lavar los pocillos **4 veces** con **300 µL** *Wash Solution* diluida por pocillo para el lavado manual. Realizar un golpe seco de los pocillos contra el papel absorbente para eliminar las gotas residuales.

Nota importante: La sensibilidad y la precisión de este ensayo se ve marcadamente influenciada por la realización correcta del proceso de lavado!

6. Adicionar **100 µL** de **Substrate Solution** a cada pocillo.
7. Incubar durante **30 minutos** a temperatura ambiente.
8. Parar la reacción enzimática mediante la adición de **100 µL** de **Stop Solution** a cada pocillo.
9. Determinar la densidad óptica (DO) de la solución en cada pocillo a **450 nm (lectura) y a 620 - 630 nm (se recomienda la sustracción de fondo)** con un lector de microplacas. Se recomienda que los pocillos se lean dentro de los **10 minutos** siguientes a la adición de la solución de parada (*Stop Solution*).

6.3. Cálculo de los Resultados

1. Calcular los valores de densidad óptica (DO) promedio para cada conjunto de estándares, controles y muestras de pacientes.
2. Construir una curva estándar mediante la representación de la DO media obtenida para cada estándar frente a su concentración con el valor de DO en el eje vertical (Y) y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Usando el valor de DOa media de cada muestra determinar la concentración correspondiente a partir de la curva estándar.
4. Método automatizado: Los resultados en las instrucciones de uso se han calculado automáticamente usando una curva de regresión 4 Parámetros. (4 Parámetros Rodbard o 4 Parámetros Marquardt son los métodos preferidos.) Otras funciones de regresión darán lugar a resultados sensiblemente diferentes.
5. La concentración de las muestra puede leerse directamente de la curva de estándares. Las muestras con concentraciones superiores al mayor estándar han de diluirse. Para el cálculo de las concentraciones hay que tener en cuenta el factor de dilución.

6.3.1. Ejemplo de una Curva Estándar Típica

Los siguientes datos son solamente para la explicación y **no** pueden ser utilizados en lugar de los datos generados en el momento del ensayo.

Estándar	Desidad Óptica (450 nm)
Standard 0 (0.0 ng/mL)	1,79
Standard 1 (0.3 ng/mL)	1,48
Standard 2 (1.2 ng/mL)	1,18
Standard 3 (4.0 ng/mL)	0,81
Standard 4 (15.0 ng/mL)	0,52
Standard 5 (40.0 ng/mL)	0,38

7. VALORES ESPERADOS

Se recomienda encarecidamente que cada laboratorio determine sus valores normales e inusuales.

7.1. Valores con adultos aparentemente sanos

En un estudio con adultos aparentemente sanos utilizando el DEMEDITEC Free Estriol ELISA se observaron los siguientes valores:

Población	n	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Percentil 5 - 95 (ng/mL)	Percentil 2,5 - 97,5 (ng/mL)	Rango (min. - max.) (ng/mL)
Hombres	42	0,359	0,367	0,146 - 0,573	0,077 - 0,878	0,075 - 0,987
Mujeres (no embarazada)	43	0,348	0,286	0,057 - 0,822	0,038 - 1,027	0,009 - 1,307

7.2. Valores durante embarazo

(p.m. = post menstruationem)

Semanas de embarazo p.m.	Valores esperados (ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Semanas de embarazo p.m.	Valores esperados (ng/mL)	Embarazo con gemelo (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

TENER EN CUENTA:

Para importancia clínica consultar el manual de usuario en inglés (Capítulo 7: EXPECTED VALUES)

8. CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda usar muestras control de acuerdo con las leyes estatales y federales. El uso de muestras control se recomienda para asegurar la validez diaria de los resultados. Usar controles tanto a niveles normal como patológico.

Los controles y los correspondientes resultados del Laboratorio de control de calidad están fijados en el certificado de control de calidad que acompañan al kit. Los valores y los rangos fijados en la hoja del control de calidad se refieren siempre al kit actual y deben usarse para la comparación directa de los resultados. Es recomendable también hacer uso de programas de Aseguramiento de la Calidad nacionales o internacionales para asegurar la exactitud de los resultados. Utilizar métodos estadísticos apropiados para el análisis de los valores y tendencia de los controles. Si los resultados del ensayo no se ajustan a los rangos aceptables establecidos en los controles, los resultados obtenidos de los pacientes han de considerarse inválidos. En este caso, por favor comprobar las siguientes áreas técnicas: Pipeteo y tiempo empleado, fotómetro, fecha de caducidad de los reactivos, condiciones de almacenamiento e incubación, métodos de aspiración y lavado.

Después de comprobar los asuntos mencionados arriba sin encontrar ningún error, contactar con su distribuidor o con DEMEDITEC directamente.

9. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

9.1. Rango dinámico del ensayo

El rango del ensayo se encuentra entre 0,021 ng/mL – 40 ng/mL.

9.2. Especificidad de los Anticuerpos (Reactividad Cruzada)

Consultar el manual de usuario en inglés.

9.3. Sensibilidad Analítica

La sensibilidad analítica se calculó a partir de la media menos dos desviaciones estándar de veinte (20) réplicas del *Estándar 0* y resultó ser 0,021 ng/mL.

Para información sobre

9.4. Precisión

9.5. Recuperación

9.6. Linealidad

por favor consulte la versión detallada en inglés de las Instrucciones de Uso.

10. LIMITACIONES DE USO

Únicamente se obtendrán resultados fiables y reproducibles, cuando el procedimiento del ensayo se realice entendiendo las instrucciones de uso correctamente y desarrollando buenas prácticas de laboratorio.

Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificaciones del ensayo pueden influenciar los resultados.

10.1. Sustancias que pueden interferir

Hemoglobina (hasta 4 mg/mL), Bilirrubina (hasta 0,125 mg/mL) y Triglicéridos (hasta 30 mg/mL) no influyen los resultados del ensayo.

10.2. Interferencias con drogas

Hasta ahora no se han encontrado sustancias (drogas) conocidas por nosotros, que tengan influencia en la medida de Estriol libre en una muestra.

10.3. Efecto Gancho-Dosis-Elevada

No se ha observado efecto gancho en este ensayo.

11. ASPECTOS LEGALES

11.1. Fiabilidad de los Resultados

El ensayo debe realizarse exactamente de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Mas aún, el usuario debe ajustarse estrictamente a las reglas BPL (Buenas Prácticas de Laboratorio) o a otros estándares y/o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de ensayo, un número suficiente de controles para validar la exactitud y la precisión del ensayo. Los resultados del ensayo son válidos sólo si todos los controles se encuentran dentro de los rangos especificados y si todos los otros parámetros del ensayo se encuentran dentro de las especificaciones dadas para el ensayo. En caso de alguna duda o inquietud, por favor, contactar con DEMEDITEC.

11.2. Consecuencias Terapéuticas

Las consecuencias terapéuticas nunca deben basarse sólo en los resultados de laboratorio incluso si todos los resultados del ensayo están de acuerdo con los asuntos fijados en el punto 11.1. Cualquier resultado de laboratorio es solamente una parte del cuadro clínico de un paciente.

Solamente en los casos donde los resultados de laboratorio están en acuerdo con todo el cuadro clínico de un paciente, se pueden derivar consecuencias terapéuticas.

Nunca deben derivarse consecuencias terapéuticas a partir de solamente el resultado obtenido en el ensayo

11.3. Responsabilidad

Cualquier modificación del kit y/o cambio o mezcla de cualquier componente procedentes de kits de lotes diferentes puede afectar negativamente a los resultados esperados y en la validez de todo el test. Esas modificaciones y/o cambios invalidan cualquier reclamación de reposición.

Las reclamaciones emitidas debidas a una mala interpretación de los resultados de laboratorio por parte del comprador referidos al punto 11.2 son también inválidas. A pesar de todo, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante no excede el valor del kit. Cualquier daño provocado al kit durante su transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

12. REFERENCIAS / BIBLIOGRAFÍA

Consultar el manual de usuario en inglés.

1. UTILISATION PRÉVUE

Le kit de dosage immuno-enzymatique Demeditec Free Estriol ELISA propose les matériaux requis pour la mesure quantitative de l'estriol libre (estriol non conjugué) dans le sérum pendant la deuxième moitié de la grossesse.

Ce kit est à utiliser uniquement dans le cadre de tests diagnostiques in vitro.

Ce kit n'est PAS destiné à être utilisé pour l'évaluation du risque de trisomie 21.

2. PRINCIPE DU TEST

Le kit DEMEDITEC Free Estriol ELISA est basé sur une réaction immuno-enzymatique compétitive. Les micro-plaques sont recouvertes avec un anticorps polyclonal dirigé contre un antigène spécifique de la molécule Estriol. L'Estriol endogène contenu(e) dans l'échantillon du patient entre en compétition avec le conjugué à la HRP pour la liaison à l'anticorps. Après incubation, le conjugué non-lié est éliminé durant le lavage des puits. La quantité de peroxidase liée est inversement proportionnelle à la concentration d'Estriol contenue dans l'échantillon. Suite à l'addition de solution substrat, l'intensité de coloration obtenue est inversement proportionnelle à la concentration de Estriol libre contenue dans l'échantillon.

3. PRECAUTIONS D'UTILISATION

- Ce kit est uniquement destiné aux tests diagnostiques in vitro.
- Utilisez uniquement la version valide d'instructions d'utilisation qui est incluse dans le kit.
- Les informations concernant la toxicité des réactifs contenus dans ce kit sont présentées dans la fiche de sécurité (« Safety Data Sheets »).
- Tous les réactifs de ce kit contenant du sérum ou du plasma humain ont été testés avec des résultats négatifs pour le VIH I/II, le HBsAg et le HCV selon les normes FDA en vigueur. Néanmoins, lors de leur utilisation, tous les réactifs de ce kit doivent être manipulés avec précaution.
- Éviter les contacts avec la *Stop Solution*, celle-ci contient 0.5 M de H₂SO₄. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
- Ne jamais pipeter avec la bouche, et éviter tout contact de la peau ou des muqueuses avec les réactifs ou les échantillons.
- Ne pas fumer, manger, boire ou utiliser des produits cosmétiques dans les zones où les échantillons ou le kit ont été maniés.
- Porter des gants d'examen lors de l'utilisation des échantillons ou des réactifs. Une contamination microbienne des échantillons ou des réactifs pourrait fausser les résultats.
- L'utilisation de ce kit devra être en accord avec les normes ou recommandations nationales de sécurité en vigueur concernant les produits à risque biologique.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de la date d'expiration inscrite sur l'emballage.
- Tous les volumes indiqués doivent être scrupuleusement respectés, comme indiqué dans le protocole expérimental. Seule l'utilisation de pipettes calibrées ou d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré garantit l'obtention de résultats optimaux à ce test.
- Ne pas mélanger ou utiliser des réactifs contenus dans des kits de lots différents. Il est conseillé de ne pas échanger les puits de différentes plaques, même si celles-ci proviennent du même lot. Les kits peuvent avoir été transportés ou stockés différemment, et les caractéristiques de liaison de chaque plaque pourraient ainsi être modifiées.
- L'élimination des solutions chimiques et des réactifs contenus dans ce kit, utilisés ou non, doit être en accord avec la réglementation nationale en vigueur concernant l'élimination des déchets à risque biologique.
- La fiche de sécurité concernant ce produit peut être obtenue en contactant directement DEMEDITEC Diagnostics GmbH.

4. COMPOSITION DU KIT

4.1. Contenu du kit

1. **SORB MT Microtiterwells** (Plaques de micro-titratio), 12 x 8 (à détacher) barrettes, plaques de 96 puits; Les puits sont recouverts avec un anticorps anti-Estriol (polyclonal).
2. **CAL 0 – 5 Standard (Standard 0-5)**, 6 flacons, 1 mL, prêt à l'emploi ;
Concentrations: 0 - 0.3 - 1.2 - 4 - 15 - 40 ng/mL.
3. **CONTROL low & high Control Low & High** (Contrôle), 2 flacons, 1 mL, prêt à l'emploi;
Les valeurs contrôles et limites sont indiquées sur la fiche QC. Contient agent de conservation sans mercure.
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate** (Conjugué enzymatique), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi,
Estriol conjugué(e) à la HRP ; Contient agent de conservation sans mercure.
5. **SUB TMB Substrate Solution** (Solution substrat), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi,
Tétraméthylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN Stop Solution** (Solution d'arrêt), 1 flacon, 14 mL, prêt à l'emploi,
contient 0.5 M de H₂SO₄ ; Eviter les contacts avec la solution stop. Cela pourrait engendrer irritations ou brûlures de la peau.
7. **WASH SOLN 40x Wash Solution** (Solution de lavage), 1 flacon (concentré 40X),
voir « Préparation des réactifs ».

Remarque : Un *Standard 0* supplémentaire peut être fourni sur demande.

4.2. Equipement et matériel requis, mais non fournis

- Un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques calibré (450 nm, avec longueur d'onde de référence à 620 nm - 630 nm)
- Des micro-pipettes de précision variables et calibrées
- Du papier absorbant
- De l'eau distillée
- Un minuteur
- Papier graphique ou logiciel pour la réduction le calcul des données

4.3. Stockage et stabilité du kit

Les réactifs contenus dans des flacons non-ouverts, stockés à 2 °C à 8 °C, seront stables jusqu'à la date d'expiration inscrite sur l'étiquette. Ne pas utiliser les réactifs au delà de cette date.

Les réactifs contenus dans des flacons ouverts doivent être stockés à 2 °C à 8 °C. Les micro-plaques doivent être stockées à 2 °C à 8 °C. Une fois la capsule d'aluminium ouverte, attention à bien refermer le flacon. Les kits ouverts conservent leur activité durant 8 semaines s'ils sont stockés comme précédemment mentionné.

4.4. Préparation des réactifs

Amener tous les réactifs et le nombre de barrettes nécessaires au test à température ambiante avant utilisation.

Wash Solution

Diluer 30 mL de *Wash Solution* concentrée avec 1170 mL d'eau distillée, pour un volume final de 1200 mL. **Remarque :** La solution de lavage diluée est stable 1 semaine à température ambiante.

4.5. Elimination des déchets relatifs au kit

L'élimination des déchets relatifs au kit doit être réalisée selon les règles nationales en vigueur. Les informations spécifiques au kit sont présentées dans la fiche de sécurité (voir chapitre 13).

4.6. Kits endommagés

Dans le cas de dommages importants survenus au kit ou ses composants, informer la DEMEDITEC, au plus tard une semaine après réception du kit. Les composants endommagés ne doivent pas être utilisés pour le test. Ils doivent être stockés jusqu'à ce qu'une solution adaptée ait été trouvée. Après cela, ils doivent être éliminés selon les directives officielles en vigueur.

5. ECHANTILLON

Sérum peuvent être utilisés pour ce test.

Remarque : Les échantillons contenant de l'azide de sodium ne doivent pas être utilisés pour ce test. En général, il faut éviter d'utiliser des échantillons hémolytiques, ictériques ou lipémiques. Pour plus d'informations, se reporter au chapitre "*Substances interférentes*".

5.1. Prélèvement et préparation des échantillons

Sérum:

Prélever le sang par ponction veineuse (ex. Sarstedt Monovette pour sérum), laisser coaguler, puis séparer le sérum par centrifugation à température ambiante. Ne pas centrifuger avant que la coagulation ne soit terminée. Les patients sous traitement anti-coagulant peuvent demander un temps de coagulation plus important.

5.2. Conservation des échantillons

Les tubes contenant les échantillons doivent être fermés et peuvent être stockés jusqu'à 7 jours à 2 °C à 8 °C avant d'être testés.

Les échantillons stockés pour un temps prolongé (jusqu'à 19 mois) doivent être congelés à -20 °C avant d'être testés. Les échantillons décongelés doivent être retournés plusieurs fois avant le test.

5.3. Dilution de l'échantillon

Si, lors d'un test préliminaire, la concentration de l'échantillon se révèle être supérieure à celle du standard le plus concentré, alors l'échantillon doit être dilué avec le *Standard 0* et testé de nouveau, comme décrit dans Réalisation du test.

Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

Exemple:

a) dilution 1:10: 10 µL Sérum + 90 µL *Standard 0* (bien mélanger).

b) dilution 1:100: 10 µL dilution a) 1:10 + 90 µL *Standard 0* (bien mélanger).

6. RÉALISATION DU TEST

6.1. Remarques générales

- Tous les réactifs et échantillons doivent être amenés à température ambiante avant utilisation. Tous les réactifs doivent être mélangés, sans formation de mousse.
- Une fois la procédure engagée, toutes les étapes doivent être réalisées sans interruption.
- Utiliser un nouvel embout de pipette pour chaque standard, contrôle ou échantillon, ceci afin d'éviter toute contamination.
- La densité optique est fonction du temps d'incubation et de la température. Avant de commencer le test, il est recommandé de préparer tous les réactifs, bouchons ouverts, de préparer les puits des microplaques, etc. Cela garantira un intervalle de temps équivalent entre chaque étape, sans interruption.
- En règle générale, la réaction enzymatique est linéairement proportionnelle au temps et à la température.

6.2. Réalisation du dosage

Chaque test doit inclure une courbe étalon.

1. Disposer le nombre de puits de micro-titration désiré dans le support.
2. Déposer **10 µL** de chaque **Standard, Control et les échantillons**, avec de nouveaux cônes de pipette, dans les puits appropriés.
3. Déposer **100 µL d'Enzyme Conjugate** dans chaque puits.
Bien mélanger pendant 10 secondes. Il est important d'obtenir un mélange parfait lors de cette étape.
4. Incuber pendant **60 minutes** à température ambiante.
5. Décanter le contenu des puits et
rincer les puits **4 fois** avec 400 µL de la *Wash Solution* diluée par puits, si un laveur de micro-plaques est utilisé
- ou -
rincer les puits **4 fois** avec **300 µL** de la *Wash Solution* diluée par puits pour un lavage manuel.
Tapoter les puits sur du papier absorbant afin d'éliminer les gouttelettes résiduelles.
Remarque importante: La sensibilité et la précision de ce test sont fortement dépendantes de la bonne réalisation des étapes de lavage !
6. Ajouter **100 µL** de **Substrate Solution** à chaque puits.
7. Incuber pendant **30 minutes** à température ambiante.
8. Stopper la réaction enzymatique en ajoutant **100 µL** de **Stop Solution** à chaque puits.
9. Déterminer la densité optique (DO) de la solution dans chaque puits à **450 nm (lecture) et à 620 - 630 nm (soustraction de fond, recommandée)** à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de micro-plaques. Il est recommandé de lire les puits dans les **10 minutes** qui suivent l'ajout de la solution d'arrêt (*Stop Solution*).

6.3. Calcul des résultats

1. Calculer les valeurs moyennes des densités optiques pour chaque série de standards, contrôles et échantillons.
2. Etablir la courbe étalon en reportant la densité optique moyenne de chaque valeur standard en fonction de sa concentration, en posant la densité optique en axe des ordonnées et la concentration en axe des abscisses.
3. L'utilisation de la densité optique moyenne pour chaque échantillon détermine la concentration correspondante à partir de la courbe étalon.
4. Méthode automatique. Les résultats dans les instructions d'utilisation ont été calculés de façon automatique en utilisant une courbe de régression 4 Paramètres. (4 paramètres Rodbard ou 4 paramètres Marquardt sont les méthodes favorites.) D'autres fonctions logistiques peuvent donner des résultats légèrement différents.
5. La concentration des échantillons peut être lue directement à partir de cette courbe étalon. Les échantillons avec une concentration supérieure à celle du standard le plus concentré doivent être dilués de nouveau. Pour le calcul des concentrations, ce facteur de dilution doit être pris en considération.

6.3.1. Exemple d'une courbe standard typique

Les résultats suivants sont ici présentés à titre d'exemple et **ne peuvent** être utilisés au moment de l'essai.

Standard		Densité optique (450 nm)
Standard 0	(0.0 ng/mL)	1,79
Standard 1	(0.3 ng/mL)	1,48
Standard 2	(1.2 ng/mL)	1,18
Standard 3	(4.0 ng/mL)	0,81
Standard 4	(15.0 ng/mL)	0,52
Standard 5	(40.0 ng/mL)	0,38

7. VALEURS ATTENDUES

Il est fortement recommandé à chaque laboratoire de déterminer ses propres valeurs normales ou anormales.

7.1. Adultes normaux (non-enceinte)

Dans une étude réalisée avec des adultes normaux et sains, à l'aide du kit DEMEDITEC Free Estriol ELISA, les valeurs suivantes sont observées :

Population	n	Valeur moyenne (ng/mL)	Mé-diane (ng/mL)	5. - 95. Percentile (ng/mL)	2,5. - 97,5. Percentile (ng/mL)	Portée (min. - max.) (ng/mL)
Hommes	42	0,359	0,367	0,146 - 0,573	0,077 - 0,878	0,075 - 0,987
Femmes (pas enceinte)	43	0,348	0,286	0,057 - 0,822	0,038 - 1,027	0,009 - 1,307

7.2. Valeur durant la grossesse

Grossesse semaines p.m.	Valeur attendues (ng/mL)
12	0,3 - 1,0
13	0,3 - 1,1
14	0,4 - 1,6
15	1,0 - 4,4
16	1,4 - 6,5
17	1,5 - 6,6
18	1,6 - 8,5
19	1,9 - 11
20	2,1 - 13
21	2,6 - 14

Grossesse semaines p.m.	Valeur attendues (ng/mL)	Gestation avec jumeaux (ng/mL)
22 - 23	2,7 - 16	3 - 18
24 - 25	2,9 - 17	3 - 20
26 - 27	3,0 - 18	4 - 21
28 - 29	3,2 - 20	4 - 22
30 - 31	3,6 - 22	5 - 25
32 - 33	4,6 - 23	6 - 39
34 - 35	5,1 - 25	7 - 39
36 - 37	7,2 - 29	9 - 38
38 - 39	7,8 - 37	13 - 40
40 - 42	8,0 - 39	---

REMARQUE: pour l'importance clinique voir le manuel d'utilisateur en version anglaise (chapitre 7 EXPECTED VALUES)

8. CONTRÔLE DE QUALITÉ

Il est recommandé d'utiliser les échantillons contrôles selon les réglementations nationales en vigueur. L'utilisation des échantillons contrôles est recommandée afin de s'assurer jour après jour de la validité des résultats. Utiliser les contrôles de valeurs normales et pathologiques.

Les contrôles et les résultats correspondants issus du laboratoire QC sont mentionnés dans le certificat QC fourni avec le kit. Les valeurs et les limites mentionnées sur la fiche QC font toujours référence au lot de kit courant et doivent être utilisées pour une comparaison directe avec les résultats. Il est également recommandé d'utiliser les programmes d'évaluation de qualité nationaux ou internationaux, afin de s'assurer de l'exactitude des résultats. Utiliser les méthodes d'analyses statistiques appropriées pour l'analyse des valeurs contrôles et des tendances. Si les résultats ne correspondent pas aux limites établies des contrôles, les résultats concernant ces patients doivent être considérées comme non valides.

Dans ce cas, tester les zones techniques suivantes : mécanisme de pipettage et temps; spectrophotomètre, dates d'expiration des réactifs, conditions de stockage et d'incubation, méthodes d'aspiration et de lavage. Après avoir testé les points mentionnés, si aucune erreur n'est détectée, contacter votre distributeur ou directement la DEMEDITEC.

9. CARACTERISTIQUES DU TEST

9.1. Zone de mesure

Les limites du dosage sont comprises entre 0,021 ng/mL – 40 ng/mL.

9.2. Spécificité des anticorps (Réaction croisée)

Consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

9.3. Sensibilité de l'analyse

La sensibilité de l'analyse a été calculée à partir de la moyenne la plus faible de deux déviations standards de l'analyse de vingt réplicats du *Standard 0* et a été mesurée à 0,021 ng/mL.

Pour obtenir des données concernant

9.4. Précision

9.5. Récupération

9.6. Linéarité

consulter la version anglaise détaillée du mode d'emploi.

10. LIMITES D'UTILISATION

Les résultats seront fiables et reproductibles si la procédure de dosage est effectuée dans le respect le plus strict des instructions et des bonnes pratiques de laboratoire.

Toute utilisation impropre des échantillons ou toute modification du test peut influencer les résultats.

10.1. Substances parasites

L'hémoglobine (jusqu'à 4 mg/mL), la bilirubine (jusqu'à 0,125 mg/mL) et les triglycérides (jusqu'à 30 mg/mL) n'ont aucune influence sur les résultats du dosage.

10.2. Drogues parasites

Jusqu'à présent, nous ne connaissons aucune substance (drogues) capable d'influencer la mesure d'Estriol libre dans un échantillon.

10.3. Effet de surdosage

Aucun effet de surdose n'a été observé avec ce test.

11. ASPECTS LEGAUX

11.1. Fiabilité des résultats

Ce test doit être exactement utilisé selon les instructions d'utilisation du fabricant. De plus, les utilisateurs doivent strictement respecter les règles de la bonne pratique de laboratoire, ou autres lois nationales. Cela est spécialement le cas pour l'utilisation des réactifs contrôles. Pour chaque test, il est important d'inclure un nombre suffisant de contrôles, afin de pouvoir valider l'exactitude et la précision du test. Les résultats du test sont valides si et seulement si tous les contrôles sont compris dans les gammes de mesure mentionnées et si tous les autres paramètres du test sont également compris dans les instructions de ce test. En cas de doute ou d'inquiétude, contacter la DEMEDITEC.

11.2. Conséquences thérapeutiques

Les suites thérapeutiques ne devront jamais être basées sur les résultats de laboratoire seuls, même si les tous les résultats du test sont en accord avec les points mentionnés dans le paragraphe 11.1. Tout résultat n'est qu'une partie du tableau clinique complet d'un patient. Les suites thérapeutiques peuvent découler des résultats de laboratoire si et seulement si ceux-ci sont en accord avec l'ensemble du tableau clinique du patient. Le résultat du test en lui-même ne doit en aucun cas être le seul déterminant des suites thérapeutiques à suivre.




11.3. Responsabilité

Toute modification du kit et / ou échange ou mélange d'un des composants de différents lots, d'un kit à un autre, pourrait affecter de façon négative les résultats attendus et la validité du test dans son ensemble. De telles modifications ou échanges invalident toute réclamation pour remplacement. Toutes les réclamations soumises, relatives au paragraphe 11.2, et dues à une mauvaise interprétation des résultats de laboratoire de la part du client sont également invalides. Néanmoins, en cas de réclamation, la responsabilité du fabricant n'est pas de dépasser les limites de la valeur du kit. Tout dommage causé au kit lors de son transport n'est pas du ressort de la responsabilité du fabricant.

12. REFERENCES / BIBLIOGRAPHIE

Voir le manuel de l'utilisateur en version anglaise.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ASSAYS

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservación	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore