



DCM022-11
Ed. 04/2016

ESTRADIOL SALIVA ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell'Estradiolo nella saliva.

IVD



LOT

Vedere etichetta esterna



$\Sigma = 96$ test

REF DKO022

DESTINAZIONE D'USO

Metodo competitivo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa dell'Estradiolo nella saliva.

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

1. SIGNIFICATO CLINICO

L'Estradiolo è un ormone sessuale. Rappresenta l'estrogeno principale negli esseri umani. L'estradiolo ha effetto sul funzionamento riproduttivo e sessuale, e interessa altri organi compresa la struttura dell'osso. Durante gli anni fertili la maggior parte dell'estradiolo nelle donne è prodotto dalle ovaie, piccoli importi sono prodotti dalla corteccia surrenale. Negli uomini, i testicoli producono l'estradiolo.

I livelli di estrogeni durante la gravidanza aumentano costantemente verso il termine. Aumenti dei livelli di estradiolo portano alla sintesi della placenta. Nelle donne in premenopausa, la produzione ovarica di estradiolo è stimolata dall'ormone luteinizzante (LH) e dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) durante il ciclo mestruale.

Nelle donne, i livelli di estradiolo misurano la fertilità e le irregolarità mestruali e sono necessari per controllare la funzionalità dei follicoli ovarici durante l'induzione di ovulazione. Nella femmina, l'estradiolo funge da ormone per lo sviluppo dei tessuti degli organi riproduttivi.

Lo sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie in donne è guidato dall'estradiolo. Estradiolo è coinvolto nella fertilità maschile.

L'estradiolo regola il mantenimento della massa ossea. Le donne in menopausa subiscono una perdita accelerata della massa ossea dovuta alla mancanza di estrogeni. L'estradiolo interessa la sintesi delle proteine, come le lipoproteine, delle proteine carrier e delle proteine responsabili della coagulazione.

Gli estrogeni hanno funzione neuroprotettiva. L'estradiolo è considerato un oncogene poiché è coinvolto in alcuni tipi di cancro, come il cancro al seno e il cancro del rivestimento uterino. In più ci sono parecchie circostanze ginecologiche benigne che dipendono dagli estrogeni quali ad esempio l'endometriosi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

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

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

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

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

La concentrazione di Estradiolo è poi calcolata utilizzando un set di calibratori a concentrazioni note di antigene.

3. REATTIVI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1. Reattivi e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (5 flaconi, 1 mL ciascuno)

CAL0	REF DCE002/2206-0
CAL1	REF DCE002/2207-0
CAL2	REF DCE002/2208-0
CAL3	REF DCE002/2209-0
CAL4	REF DCE002/2210-0

2. Controlli (2 flaconi, 1 mL ciascuno)

Control A	REF DCE045/2203A-0
Control B	REF DCE045/2203B-0

La concentrazione dei Controlli è indicata sul Certificato di Analisi

3. Incubation Buffer (1 flacone, 30 mL)

HEPES buffer pH 7,5, BSA 1 g/L
REF DCE001/2201-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Estradiolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP)
REF DCE002/2202-0

5. Coated Microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti Estradiolo adsorbito sulla micropiastra
REF DCE002/2203-0

6. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004-0

7. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)
Acido Solforico 0,15 mol/L (*evitare il contatto con la pelle*) **REF DCE005-0**

7. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3. Materiale e strumentazione ausiliare

Dispensatori automatici.

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

Saliva Collection Device

REF DKO063

Salivette Sarstedt

REF 51.1534.500

Note

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

Aprire la busta del Reattivo 5 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strip da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strip che non vengono utilizzate nella seduta analitica.

4. AVVERTENZE

- Questo test kit è per uso in vitro, da eseguire da parte di personale esperto. Non per uso interno o esterno su esseri Umani o Animali.
- Usare i previsti dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le Buone Pratiche di Laboratorio (GLP) per la manipolazione di prodotti derivati da sangue.
- Alcuni reagenti contengono piccole quantità di Proclin 300^R come conservante. Evitare il contatto con la pelle e le mucose.
- Il TMB Substrato contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito attraverso la cute. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con la cute e con gli occhi.
- La Stop Solution è costituita da una soluzione di acido solforico diluito. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire possibili ustioni chimiche, evitare il contatto con la cute e con gli occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/H₂O₂ a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.
- Questo metodo consente di determinare concentrazioni di Estradiolo da 1 pg/mL a 100 pg/mL.
- La somministrazione di steroidi naturali o sintetici può alterare i livelli salivari di Estradiolo.

5. PRECAUZIONI

- Si prega di attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi indicata in questo protocollo. I risultati presentati qui sono stati ottenuti usando specifici reagenti elencati in queste Istruzioni per l'Uso.
- Tutti i reattivi devono essere conservati a temperatura controllata di 2-8°C nei loro contenitori originali. Eventuali eccezioni sono

chiaramente indicate. I reagenti sono stabili fino alla data di scadenza se conservati e trattati seguendo le istruzioni fornite.

- Prima dell'uso lasciare tutti i componenti dei kit e i campioni a temperatura ambiente (22-28°C) e mescolare accuratamente.
- Non scambiare componenti dei kit di lotti diversi. Devono essere osservate le date di scadenza riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.
- Qualora si utilizzi strumentazione automatica, è responsabilità dell'utilizzatore assicurarsi che il kit sia stato opportunamente validato.
- Un lavaggio incompleto o non accurato dei pozzetti può causare una scarsa precisione e/o un'elevato background. Per migliorare le prestazioni del kit su strumentazione automatica, si consiglia di aumentare il numero di lavaggi.
- Per la riproducibilità dei risultati, è importante che il tempo di reazione di ogni pozzetto sia lo stesso. Per evitare il time shifting durante la dispensazione degli reagenti, il tempo di dispensazione dei pozzetti non dovrebbe estendersi oltre i 10 minuti. Se si protrae oltre, si raccomanda di seguire lo stesso ordine di dispensazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva di calibrazione in ogni piastra.
- L'aggiunta del TMB Substrato dà inizio ad una reazione cinetica, la quale termina con l'aggiunta della Stop Solution. L'aggiunta del TMB Substrato e della Stop Solution deve avvenire nella stessa sequenza per evitare tempi di reazione differenti.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori clinici testando controlli e/o pool di sieri.
- Osservare la massima precisione nella ricostituzione e dispensazione dei reagenti.
- Non usare campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici o emolizzati.
- I lettori di micropiastre leggono l'assorbanza verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione dei Calibratori (C₀...C₄)

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

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
pg/mL	0	1	5	20	100

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

Per SI UNITS: ng/mL x 3,76 = nmol/L

6.2. Preparazione della Wash Solution

Prima dell'uso, diluire il contenuto di ogni fiala di soluzione di lavaggio tamponata concentrata (50x) con acqua distillata fino al volume di 1000 mL. Per preparare volumi minori rispettare il rapporto di

diluizione di 1:50. La soluzione di lavaggio diluita è stabile a 2÷8°C per almeno 30 giorni.

6.3. Preparazione del Coniugato Diluito

Preparare al momento dell'uso.

Diluire 10 µL di Conjugate (reattivo 3) con 1 mL di Incubation Buffer (reattivo 2).

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

6.4. Preparazione di campioni e controlli

La determinazione di Estradiolo in questo kit deve essere effettuata su campioni di saliva.

Per la raccolta del campione si consiglia l'utilizzo di tubi in vetro da centrifuga e di una cannuccia in plastica, o dei *Saliva Collection Device* Diametra, o delle "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Altri tipi di dispositivi di raccolta commercialmente disponibili non sono stati testati.

I controlli sono pronti all'uso.

6.4.1. Metodo e limitazioni

Raccogliere i campioni di saliva nei tempi indicati.

Se non vengono date indicazioni specifiche per la raccolta delle salive, è possibile raccogliere i campioni in qualsiasi momento ma tenendo conto dei seguenti fattori:

- Se la raccolta della saliva viene effettuata al mattino, questa deve essere prelevata prima di lavarsi i denti.
- Durante la giornata attendere almeno un'ora dopo aver mangiato, aver assunto farmaci per via orale o essersi lavati i denti.
- E' molto importante ottenere un campione limpido – non contaminato da cibo, cosmetici, sangue, chewing gum od altri materiali estranei.

6.4.2. Processazione delle salive con il metodo *Saliva Collection Device* Diametra

- Far defluire la saliva attraverso la cannuccia nel tubo di vetro.
- Centrifugare il campione per 15 minuti a 3000 rpm
- Porlo a – 20°C per almeno 1 ora
- Centrifugare ancora per 15 minuti a 3000 rpm
- Il campione di saliva è così pronto per essere testato.
- Conservare il campione a 2÷8°C per una settimana o a – 20°C per un tempo maggiore.

6.4.3. Processazione delle salive con il metodo *Salivette* Sarstedt

- Rimuovere il tampone contenuto nell'apposita provetta all'interno del tubo.
- Mettere il tampone in bocca e bagnare con la saliva per circa 1 minuto.
- Riporre il tampone nell'apposita provetta all'interno del tubo e chiudere il tubo con l'apposto tappo.
- Centrifugare il tubo a 1000g (rcf) per 2 minuti
- Rimuovere il tampone e la provetta e recuperare la saliva sul fondo del tubo (almeno 1 mL di saliva dovrebbe essere recuperato con questo metodo).

6.5. Procedimento

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C).** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essiccante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₄), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controllo	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₄	100 µL		
Campione / Controllo		100 µL	
Coniugato Diluito	100 µL	100 µL	
Incubare a 37°C per 2 h. Allontanare la miscela di reazione; lavare i pozzetti 3 volte con 0,3 mL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra invertita su fogli di carta assorbente. Lavaggi automatici: se si utilizza strumentazione automatica effettuare almeno 5 lavaggi.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 15 minuti a temperatura ambiente (22÷28°C), al riparo dalla luce .			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Agitare delicatamente la micropiastra. Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm contro una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm oppure contro il Bianco entro 5 minuti.			

7. CONTROLLO QUALITA'

Ogni laboratorio dovrebbe analizzare i campioni nella gamma dei livelli elevati, normali e bassi di Estradiolo per il controllo delle prestazioni dell'analisi. Questi campioni dovrebbero essere trattati come ignoti ed i valori determinati in ogni test effettuato. Le tabelle di controllo qualità dovrebbero essere effettuate per seguire le prestazioni dei reagenti forniti. Metodi statistici adeguati dovrebbero essere impiegati per accertare il trend. Il laboratorio dovrebbe fissare i limiti di accettabilità di prestazioni dell'analisi. Altri

parametri che dovrebbero essere controllati includono le intercette di 80, 50 e 20% della curva di calibrazione per valutare la riproducibilità. In più, la capacità di assorbimento massima dovrebbe essere costante con l'esperienza precedente. La deviazione significativa dalle prestazioni stabilite può indicare il cambiamento inosservato negli stati o nella degradazione sperimentali dei reagenti del kit. Reagenti freschi dovrebbero essere usati per determinare il motivo delle variazioni.

8. RISULTATI

8.1. Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (E_m) di ciascun punto della curva di calibrazione (C_0 - C_4) e di ogni campione.

8.2. Curva di calibrazione

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

8.3. Calcolo dei risultati

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

9. VALORI DI RIFERIMENTO

Siccome i valori dell'Estradiolo Saliva hanno un ritmo cicardiano suggeriamo di raccogliere i campioni alla stessa ora (8 A.M.).

I seguenti valori devono essere usati come guida preliminare fino a quando ogni laboratorio ha stabilito il proprio range di normalità.

		pg/mL
DONNE:	fase follicolare	1 – 20
	Picco ovulatorio	10 – 40
	Fase luteinica	5 – 25
	Menopausa	< 10
BAMBINI:		< 20
UOMINI:		< 20

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

10. PARAMETRI CARATTERISTICI

10.1. Precisione

10.1.1. Intra-Assay

La variabilità all'interno dello stesso kit è stata determinata replicando (20x) la misura di due differenti campioni di controllo. La variabilità intra-assay è 10,3%.

10.1.2. Inter-Assay

La variabilità tra kit differenti è stata determinata replicando (10x) la misura di tre differenti campioni di controllo con kit appartenenti a lotti diversi. La variabilità inter-assay è 13,6%.

10.2. Accuratezza

La prova di recupero condotta su un campione di saliva arricchito con 2,5 – 10 – 50 pg/mL di Estradiolo, ha dato un valore medio (\pm SD) di 106,84% \pm 7,80%.

10.3. Sensibilità

La concentrazione minima di Estradiolo misurabile che può essere distinta dal Calibratore 0 è 0,5 pg/mL con un limite di confidenza del 95%.

10.4. Specificità

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

Estradiolo	100%
Estrone	2%
Estriolo	0,39%
Testosterone	0,02%
Cortisolo	< 7×10^{-3} %
Progesterone	< 3×10^{-4} %
Dhea-s	< 1×10^{-4} %

10.5. Correlazione

Il kit Estradiol saliva (Diametra) è stato comparato con un kit disponibile in commercio. Sono stati testati 22 campioni di saliva. La curva di regressione è :
 (Diametra kit) = $0,98 \cdot$ (DRG Elisa kit) + 0,08
 $r^2 = 0,961$

11. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

BIBLIOGRAFIA

1. Joshi, U.M., et al, Steroids 34 (1) 35(1979)
2. D.Exley and R. Abuknesha, Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
3. Ismail, et al J. Clin:Endocrin. Metab: 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski K.M.,et al Steroids 29 - 5 (1977)
5. Wisdom G.B., Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
6. D. Sadem, et al J. of Immunological Meth. 28 125-131 (1979)
7. C.M.Worthman, et al Clin. Chem. 36/10 1769 – 1773 (1990)
8. Y. Lu, et al Fertility and Sterility Vol 71, No.5, May 99

Ed. 04/2016

DCM022-11

DiaMetra S.r.l. Headquater: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM022-11
Ed. 04/2016

ESTRADIOL SALIVA ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of Estradiol in saliva.

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO022

INTENDED USE

Competitive immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of Estradiol concentration in saliva.

Estradiol Saliva ELISA kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

Estradiol (17 -estradiol) is a sex hormone. It represents the major estrogen in humans. Estradiol has not only a critical impact on reproductive and sexual functioning, but also affects other organs including bone structure.

During the reproductive years most estradiol in women is produced by the ovaries, smaller amounts of estradiol are also produced by the adrenal cortex. In men, the testes produce estradiol.

During pregnancy estrogen levels including estradiol rise steadily towards term. Estradiol increases due to placental production.

In adult premenopausal women, ovarian estradiol production is stimulated by the interactions of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) throughout the menstrual cycle.

In adult women, estradiol levels are measured in the evaluation of fertility and menstrual irregularities, and to monitor ovarian follicular function during induction of ovulation

In the female, estradiol acts as a growth hormone for tissue of the reproductive organs.

The development of secondary sexual characteristics in women is driven by estradiol. Estradiol is involved in man fertility.

Estradiol regulate the bone maintenance. Women who past the menopause experience an accelerated loss of bone mass due to a relative estrogen deficiency.

Estradiol affects the production of multiple proteins including lipoproteins, binding proteins, and proteins responsible for blood clotting.

Estrogens have been found to have neuroprotective function.

Estrogen is considered an oncogene as its supports certain cancers, notably breast cancer and cancer of the uterine lining. In addition there are several benign gynecologic conditions that are dependent on estrogen such as endometriosis, leiomyomata uteri, and uterine bleeding.

2. PRINCIPLE

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

After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing.

Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blu color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added.

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

Estradiol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (5 vial, 1 mL each)

CAL0	REF DCE002/2206-0
CAL1	REF DCE002/2207-0
CAL2	REF DCE002/2208-0
CAL3	REF DCE002/2209-0
CAL4	REF DCE002/2210-0

2. Controls (2 vials, 1 mL each)

Control A	REF DCE045/2203A-0
Control B	REF DCE045/2203B-0

Controls Concentration is indicated on the Certificate of Analysis

3. Incubation Buffer (1 vial, 30 mL)

HEPES buffer pH 7.5, BSA 1 g/L
REF DCE001/2201-0

4. Conjugate (1 vial, 1 mL)

Estradiol conjugated with Horseradish peroxidase(HRP)
REF DCE002/2202-0

5. Coated Microplate (1 breakable microplate)

Anti Estradiol antibody adsorbed on microplate
REF DCE002/2203-0

6. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004-0

7. **Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (*avoid any skin contact*)
REF DCE005-0
7. **50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reagents necessary not supplied

Distilled water.

3.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Saliva Collection Device **REF DKO063**

Salivette Sarstedt **REF 51.1534.500**

Note

Store all reagents at 20±8°C in the dark.

Open the bag of reagent 5 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened, the microplate is stable until the expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the unused strips

4. WARNINGS

- This kit is intended for in vitro use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- Some reagents contain small amounts of Proclin 300^R as preservative. Avoid the contact with skin or mucosa.
- The TMB Substrate contains an irritant, which may be harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous and corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to directed sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- This method allows the determination of Estradiol from 1 pg/mL to 100 pg/mL.
- The clinical significance of the determination Estradiol can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.

- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1. Preparation of the Calibrators (C₀...C₄)

Before use, mix for 5 minutes with a rotating mixer.

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
pg/mL	0	1	5	20	100

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

For SI UNITS: ng/mL x 3,76 = nmol/L

6.2. Preparation of Wash Solution

Dilute the contents of each vial of the buffered wash solution concentrate (50x) with distilled water to a final volume of 1000 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:50 dilution ratio. The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

6.3. Preparation of Diluted Conjugate

Prepare immediately before use.

Add 10 µL of Conjugate (reagent 3) to 1.0 mL of Incubation Buffer (reagent 2). Mix gently. Stable 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.4. Preparation of Samples and Controls

The determination of Estradiol with this kit should be performed in saliva samples.

It is recommended to collect saliva samples with a centrifuge glass tube and a plastic straw, with the *Diametra Saliva Collection Device* or with the "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Other commercially available sample collector devices have not been tested.

The controls are ready to use.

6.4.1. Method and Limitations

Collect saliva samples at the times indicated.

If no specific instructions have been given, saliva samples may be collected at any time; however the following should be noted:

- If saliva collection is carried out in the morning ensure that this is carried out prior to brushing teeth
- During the day allow 1 hour after a meal, oral intake of pharmaceutical drugs or tooth cleaning.
- It is very important that a good clear sample is received – i.e. no contamination with food, lipstick, blood (bleeding gums) or other extraneous materials.

6.4.2. Saliva Processing Instructions with *Saliva Collection Device Diametra*

- Let the saliva flow down through the straw into the centrifuge glass tube.
- Centrifuge the sample for 15 minutes at 3000 rpm
- Store at – 20°C for at least 1 hour
- Centrifuge again for 15 minutes at 3000 rpm
- The saliva sample is now ready to be tested.
- Store the sample at 2–8°C for one week or at – 20°C for longer time.

6.4.3. Saliva Processing Instructions with *Salivette Sardstedt*

- Remove the swab from the suspended insert of the Salivette
- Gently chewing the swab for 1 minute produces a sufficient quantity of saliva.
- Replace the swab into the Salivette and firmly close the tube using the stopper.
- Centrifuge the Salivette for 2 minutes at 1000g (rcf) for saliva generation.
- Remove the insert complete with the swab from the centrifuge vessel and discard. The clear saliva is now ready for analysis (at least 1 mL of saliva should be recovered with this method).

6.5. Procedure

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

- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀–C₄), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample / Control	Blank
Calibrator C ₀ –C ₄	100 µL		
Sample / Control		100 µL	
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate at +37°C for 2 hours. Remove the contents from each well. Wash the wells 3 times with 300 µL of diluted wash solution. Important note: during each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel. Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22–28°C) for 15 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL
Shake gently the microplate. Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620–630 nm or against Blank within 5 minutes.			

7. QUALITY CONTROL

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

8. RESULTS

8.1. Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbance (Em) for each point of the calibration curve (C₀-C₄) and of each sample.

8.2. Calibration curve

Plot the mean value of absorbance (Em) of the Calibrators (C₀-C₄) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points. (es: Four Parameter Logistic).

8.3. Calculation of Results

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

9. REFERENCE VALUES

As the values of salivary Estradiol have a circadian pattern we suggest to collect the samples at the same hour (8 A.M.):

The following values can be used as preliminary guideline until each laboratory established its own normal range.

		pg/mL
WOMEN:	Follicular phase	1 – 20
	Ovulatory peak	10 – 40
	Luteinic phase	5 – 25
	Menopause	< 10
CHILDREN:		< 20
MEN:		< 20

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

10. PERFORMANCE AND CHARACTERISTICS

10.1. Precision

10.1.1. Intra Assay Variation

Within run variation was determined by replicate the measurements (20x) of two different control samples in one assay. The within assay variability is 10.3%.

10.1.2. Inter Assay Variation

Between run variation was determined by replicate the measurements (10x) of three different control samples in different lots of kit. The between assay variability is 13.6%

10.2. Accuracy

The recovery of 2.5 – 10 – 50 pg/mL of Estradiol added to "saliva-free" sample gave an average value

(±SD) of 106.84% ± 7.80% with reference to the original concentrations.

10.3. Sensitivity

The lowest detectable concentration of Estradiol that can be distinguished from the Calibrator 0 is 0.5 pg/mL at the 95% confidence limit.

10.4. Specificity

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

Estradiol	100%
Estrone	2%
Estriol	0.39%
Testosterone	0.02%
Cortisol	< 7x10 ⁻³ %
Progesterone	< 3x10 ⁻⁴ %
Dhea-s	< 1x10 ⁻⁴ %

10.5. Correlation

Diametra Estradiol saliva ELISA kit was compared to another commercially available Estradiol saliva assay. 22 saliva samples were analysed according in both test systems.

The linear regression curve was calculated:
(Diametra kit) = 0.98*(DRG Elisa kit) + 0.08
r² = 0.961

11. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local regulations.

BIBLIOGRAPHY

1. Joshi, U.M., et al, Steroids 34(1)35(1979)
2. D.Exley, Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
3. Ismail, et al J. Clin:Endocrin. Metab: 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski,K.M.,et al Steroids 29 - 5 (1977)
5. Wisdom G.B., Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
6. Dora Sadem, et al J. of Immunol. Meth. 28 (1979) 125-131
7. C.M.Worthman, et al Clin. Chem. 36/10 1769–1773 (1990)
8. Y. Lu, et al Fertility and Sterility Vol 71, No.5, May 99

Ed. 04/2016

DCM022-11

DiaMetra S.r.l. Headquarter: Via Calabria 15,
20090 SEGRATE (MI) Italy
Tel. +39-02-2139184
Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14
06038 SPELLO (PG) Italy
Tel. +39-0742-24851
Fax +39-0742-316197
E-mail: info@diametra.com



DCM022-11
Ed. 04/2016

ESTRADIOL SALIVA ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de estradiol en la saliva.

IVD



LOT

Ver etiqueta externa



$\Sigma = 96$ ensayos

REF DKO022

USO PREVISTO

Método competitivo inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de estradiol en la saliva.

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

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

El estradiol es una hormona sexual. Representa el estrógeno principal en los seres humanos. El estradiol afecta al funcionamiento reproductivo y sexual, e interfiere en otros órganos, incluida la estructura ósea. Durante los años fértiles, la mayor parte de estradiol en las mujeres se produce por los ovarios, y pequeñas cantidades se producen por la corteza suprarrenal. En los hombres, los testículos produce el estradiol.

Los niveles de estrógenos durante el embarazo aumentan constantemente hacia el final. Los aumentos de los niveles de estradiol llevan a la síntesis de la placenta. En las mujeres con premenopausia, la producción ovárica de estradiol se estimula por la hormona luteinizante (LH) y por la hormona estimulante del folículo (FSH) durante el ciclo menstrual.

En las mujeres, los niveles de estradiol miden la fertilidad y las irregularidades menstruales, y son necesarios para controlar el funcionamiento de los folículos ováricos durante la inducción de la ovulación. En las mujeres, el estradiol actúa como hormona para el desarrollo de los tejidos de los órganos reproductores.

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

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

Los estrógenos tienen una función neuroprotectora. El estradiol se considera un oncógeno, ya que está involucrado en algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama y el cáncer del revestimiento uterino. Además, existen distintas circunstancias

ginecológicas benignas que dependen de los estrógenos, como por ejemplo la endometriosis.

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El estradiol (antígeno) presente en la muestra compete con el antígeno marcado con peroxidasa de rabano (HRP) frente al anticuerpo anti-estradiol absorbido en la microplaca (fase sólida).

Después de la incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida. Por último, la enzima HRP presente en la fracción unida cataliza la reacción entre el sustrato (H_2O_2) y el Sustrato TMB, desarrollando una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parada (H_2SO_4). La intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de estradiol presente en la muestra.

La concentración de estradiol en la muestra se calcula tomando como base una curva de calibración.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1. Reactivos y materiales suministrados en el kit

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

CAL0	REF DCE002/2206-0
CAL1	REF DCE002/2207-0
CAL2	REF DCE002/2208-0
CAL3	REF DCE002/2209-0
CAL4	REF DCE002/2210-0

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

Control A	REF DCE045/2203A-0
Control B	REF DCE045/2203B-0

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

3. Tampón de incubación (1 frasco, 30 mL)

Tampón HEPES pH 7,5 BSA 1 g/L	REF DCE001/2201-0
-------------------------------	-------------------

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Estradiol conjugado con peroxidasa de rabano (HRP)	REF DCE002/2202-0
--	-------------------

5. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anticuerpo anti estradiol absorbido en la microplaca	REF DCE002/2203-0
--	-------------------

6. Substrato TMB (1 frasco, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0,26 g/L) (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE004-0
7. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)
Ácido sulfúrico 0,15 mol/L (*evitar el contacto con la piel*)
REF DCE005-0
8. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)
NaCl 45 g/L; Tween-20 55 g/L **REF DCE006-0**

3.2. Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3. Material e instrumentación auxiliares

Dispensadores automáticos.

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

Dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*)

Salivette Sarstedt

REF DKO063

REF 51.1534.500

Nota

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

Abrir la bolsa del reactivo 5 (microplaca recubierta) solo cuando se encuentre a temperatura ambiente y cerrarla inmediatamente después de extraer las tiras que se vayan a utilizar; una vez abierta, permanece estable hasta la fecha de caducidad del kit.

No retirar las hojas adhesivas de las tiras que no se vayan a usar en la sesión de análisis.

4. ADVERTENCIAS

- Este kit de ensayo está previsto para usarse in vitro y por personal experto. No es para uso interno o externo en humanos o animales.
- Usar los equipos de protección individual previstos al trabajar con los reactivos suministrados.
- Siga las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) en el manejo de las muestras sanguíneas y sus derivados.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de Proclin 300^R como conservante. Evite el contacto con la piel y las mucosas.
- El cromógeno TMB contiene un irritante que puede ser dañino si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para prevenir lesiones, evitar la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y con los ojos.
- La Solución de Parada está formada por una solución de ácido sulfúrico diluido. El ácido sulfúrico es venenoso y corrosivo, y puede ser tóxico si se ingiere. Para prevenir posibles quemaduras químicas, evitar el contacto con la piel y con los ojos.
- Evite la exposición de los reactivos TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, metales u oxidantes. No congelar la solución.
- Este método permite determinar concentraciones de estradiol de 1 pg/mL a 100 pg/mL.
- El suministro de esteroides naturales o sintéticos puede alterar los niveles salivales de estradiol.

5. PRECAUCIONES

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

6. PROCEDIMIENTO

6.1. Preparación de los Calibradores (C₀...C₄)

Antes del uso, dejar durante al menos 5 minutos en el agitador giratorio.

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

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄
pg/mL	0	1	5	20	100

Estables 6 meses a 2÷8°C desde la apertura de los frascos.

Unidades del SI: ng/mL x 3.76 = nmol/L

6.2. Preparación de la solución de lavado

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

6.3. Preparación del conjugado diluido

Preparar inmediatamente antes del uso.

Diluir 10 µL de Conjugado (reactivo 3) con 1 mL de Tampón de incubación (reactivo 2). Mezclar con cuidado. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Preparación de la muestra e controles

La determinación de Estradiol en este kit debe ser realizada con una muestra de saliva.

Para la obtención de la muestra se recomienda usar tubos de vidrio de centrifuga y una cánula de plástico, o el dispositivo para la obtención de saliva (*Saliva Collection Device*) de Diametra o el dispositivo "Salivette" (Sarstedt, Ref. 511534500). Los otros tipos de dispositivos de obtención disponibles en el mercado no se han comprobado.

Los Controles están listos para usar.

6.4.1. Método y limitaciones

Obtener las muestras de saliva en los tiempos indicados.

Si no se dan indicaciones específicas para la obtención de saliva, es posible obtener las muestras en cualquier momento, pero teniendo en cuenta los siguientes factores:

- Si la obtención de saliva debe realizarse por la mañana, deberá realizarse antes de lavarse los dientes.
- Durante el día para las siguientes condiciones, antes de tomar una muestra de saliva, esperar por lo menos una hora si ha comido, si ha tomado medicamentos por vía oral o si se ha cepillado los dientes.
- Es muy importante obtener una muestra limpia (no contaminada con comida, cosméticos, sangre, chicle u otros materiales extraños).

6.4.2. Procesamiento de la saliva con el equipo *Saliva Collection Device Diametra*

- Hacer fluir la saliva a través de la cánula hasta el tubo de vidrio.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos a 3000 rpm
- Dejar a -20°C durante al menos 1 hora
- Centrifugar durante otros 15 minutos a 3000 rpm
- La muestra de saliva está lista para el ensayo.
- Conservar la muestra a 2÷8°C durante una semana o a -20°C para períodos más largos.

6.4.3. Extracción y manejo de la muestra con el equipo *Salivette Sarstedt*

- Retirar la torunda contenida en el apósito tubo.
- Introducir la torunda en la boca y mojarla con saliva durante 1 minuto
- Devolver la torunda en el tubo original y cerrar.
- Centrifugar el tubo a 1000g (RCF) durante 2 minutos.
- Destapar el tubo y recuperar la saliva (se debería obtener por lo menos 1mL de saliva)

6.5. Procedimiento

- Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C).** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8 ° C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₄	100 µL		
Muestra/ Control		100 µL	
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
<p>Incubar a 37°C durante 2 h. Retirar la mezcla de reacción, lavar los pocillos 3 veces añadiendo 0,3 mL de solución de lavado diluida.</p> <p>Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.</p> <p>Lavados automático: si está utilizando una lavadora automática, lavar los pocillos al menos 5 veces.</p>			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Incubar 15 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.</p>			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
<p>Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.</p>			

7. CONTROL DE CALIDAD

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

8. RESULTADOS

8.1. Absorbancia media

Calcular la absorbancia media (Em) de cada punto de la curva de calibración (C₀-C₄) y de cada muestra.

8.2. Curva de calibración

Trazar en el gráfico de las absorbancias los valores calculados de las absorbancias medias (Em) de cada Calibrador (C₀-C₄) en función de las concentraciones. Trazar la curva de ajuste óptimo para los puntos de calibración (p. ej.: Logística de cuatro parámetros).

8.3. Cálculo de los resultados

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

9. VALORES DE REFERENCIA

Puesto que los valores de estradiol en la saliva tienen un ritmo circadiano, se recomienda obtener las muestras a la misma hora (8 a.m.):

Se deben usar los siguientes valores como guía preliminar hasta que cada laboratorio establezca su propio rango de normalidad.

		pg/mL
MUJERES:	fase folicular	1 – 20
	Pico ovulatorio	10 – 40
	Fase lútea	5 – 25
	Menopausia	< 10
NIÑOS:		< 20
HOMBRES:		< 20

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

10. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

10.1. Precisión

10.1.1. Intraensayo

La variabilidad dentro del mismo kit se ha determinado replicando (20x) la medición de dos muestras de control distintas. La variabilidad intraensayo es 10,3%.

10.1.2. Interensayo

La variabilidad entre distintos kits se ha determinado replicando (10x) la medición de tres muestras de control distintas con kits pertenecientes a lotes distintos. La variabilidad interensayo es 13,6%.

10.2. Exactitud

La prueba de recuperación realizada en una muestra de saliva enriquecida con 2,5 – 10 – 50 pg/mL de estradiol ha dado un valor medio (\pm SD) de 106,84% \pm 7,80%.

10.3. Sensibilidad

La concentración mínima de estradiol medible que puede distinguirse del Calibrador cero es 0,5 pg/mL con un límite de confianza del 95%.

10.4. Especificidad

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

Estradiol	100%
Estrona	2%
Estriol	0,39%
Testosterona	0,02%
Cortisol	$< 7 \times 10^{-3} \%$
Progesterona	$< 3 \times 10^{-4} \%$
Dhea-s	$< 1 \times 10^{-4} \%$

10.5. Correlación

El kit Estradiol saliva Diametra se ha comparado con un kit disponible en el mercado. Se han comprobado 22 muestras de saliva.

La curva de regresión es:

$$(\text{Kit Diametra}) = 0,98 * (\text{Kit Elisa DRG}) + 0,08$$

$$r^2 = 0,961$$

11. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Joshi, U.M., et al, Steroids 34 (1) 35(1979)
2. D.Exley and R. Abuknesha, Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
3. Ismail, et al J. Clin:Endocrin. Metab: 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski K.M.,et al Steroids 29 - 5 (1977)
5. Wisdom G.B., Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
6. D. Sadem, et al J. of Immunological Meth. 28 125-131 (1979)
7. C.M.Worthman, et al Clin. Chem. 36/10 1769 – 1773 (1990)
8. Y. Lu, et al Fertility and Sterility Vol 71, No.5, May 99

Ed. 04/2016

DCM022-11

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

Manufactory: Via Pozzuolo 14,
06038 SPELLO (PG) Italy

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com

	DE ES FR GB IT PT	In vitro Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico In vitro Dispositif medical de diagnostic in vitro In vitro Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico in vitro Dispositivos medicos de diagnostico in vitro		DE ES FR GB IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR GB IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR GB IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR GB IT PT	Verwendbar bis Establa hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso	LOT	DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes	CONT	DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Límitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação	REF	DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

SUGGERIMENTI PER LA RISOLUZIONE DEI PROBLEMI/TROUBLESHOOTING**ERRORE CAUSE POSSIBILI/ SUGGERIMENTI****Nessuna reazione colorimetrica del saggio**

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

Reazione troppo blanda (OD troppo basse)

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

Reazione troppo intensa (OD troppo alte)

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

Valori inspiegabilmente fuori scala

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

CV% intrasaggio elevato

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

CV% intersaggio elevato

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

ERROR POSSIBLE CAUSES / SUGGESTIONS**No colorimetric reaction**

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

Too low reaction (too low ODs)

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

Too high reaction (too high ODs)

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

Unexplainable outliers

- contamination of pipettes, tips or containers
- insufficient washing (conjugates not properly removed) too high within-run
- reagents and/or strips not pre-warmed to CV% Room Temperature prior to use
- plate washer is not washing correctly (suggestion: clean washer head)
- too high between-run - incubation conditions not constant (time, CV % temperature)
- controls and samples not dispensed at the same time (with the same intervals) (check pipetting order)
- person-related variation

ERROR / POSIBLES CAUSAS / SUGERENCIAS**No se produce ninguna reacción colorimétrica del ensayo**

- no se ha dispensado el conjugado
- contaminación del conjugado y/o del sustrato
- errores en la ejecución del ensayo (p. ej., dispensación accidental de los reactivos en orden incorrecto o procedentes de frascos equivocados, etc.)

Reacción escasa (DO demasiado bajas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado corto, temperatura de incubación demasiado baja

Reacción demasiado intensa (DO demasiado altas)

- conjugado no idóneo (p. ej., no procedente del kit original)
- tiempo de incubación demasiado largo, temperatura de incubación demasiado alta
- calidad escasa del agua usada para la solución de lavado (bajo grado de desionización)
- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

Valores inexplicablemente fuera de escala

- contaminación de pipetas, puntas o contenedores- lavados insuficientes (el conjugado no se ha retirado completamente)

CV% intraensayo elevado

- los reactivos y/o tiras no se encontraban a temperatura ambiente antes del uso
- el lavador de microplacas no funciona correctamente (sugerencia: limpiar el cabezal del lavador)

CV% interensayo elevado

- condiciones de incubación no constantes (tiempo o temperatura)
- controles y muestras no dispensados al mismo tiempo (con los mismos intervalos) (controlar la secuencia de dispensación)
- variación en función de los operadores

ERREUR CAUSES POSSIBLES / SUGGESTIONS**Aucune réaction colorimétrique de l'essai**

- non distribution du conjugué
- contamination du conjugué et/ou du substrat
- erreurs dans l'exécution du dosage (par ex., distribution accidentelle des réactifs dans le mauvais ordre ou en provenance des mauvais flacons, etc.)

Réaction trop faible (DO trop basse)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop court, température d'incubation trop basse

Réaction trop intense (DO trop élevée)

- conjugué non approprié (par ex., ne provenant pas du coffret original)
- temps d'incubation trop long, température d'incubation trop élevée
- mauvaise qualité de l'eau utilisée pour la solution de lavage (bas degré de déionisation)
- lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

Valeurs inexplicablement hors plage

- contamination des pipettes, embouts ou récipients - lavages insuffisants (conjugué non entièrement éliminé)

CV% intra-essai élevé

- les réactifs et/ou les bandes n'ont pas atteint la température ambiante avant usage
- le laveur de microplaques ne lave pas correctement (suggestion : nettoyer la tête du laveur)

CV% inter-essai élevé

- conditions d'incubation non constantes (temps ou température)
- contrôles et échantillons non distribués en même temps (avec les mêmes intervalles) (contrôler l'ordre de distribution)
- variabilité intrinsèque des opérateurs