



DCM074-5
Ed. 01/2015

S100B ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta dell' S100B in siero o plasma umano

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO074

DESTINAZIONE D'USO

Metodo immunoenzimatico colorimetrico per la determinazione quantitativa della concentrazione di S100B in siero o plasma umano.

Il kit S100B ELISA è destinato al solo uso di laboratorio.

1. SIGNIFICATO CLINICO

S100 è una proteina di 20 kDa appartenente alla superfamiglia S100/calmoduline/troponine C delle proteine EF-calcio leganti. S100 è stata inizialmente isolata dal cervello umano e considerata come una proteina specifica delle cellule gliali (1). Oggi, 20 monomeri della famiglia S100 sono stati identificati basandosi sulle somiglianze strutturali e funzionali (2,3). La maggiore parte delle proteine S100 esistono come dimeri e hanno una espressione cellulare specifica. Due dei monomeri S100, S100α e S100β (4), sono altamente conservati tra le specie e sono trovati come omodimeri (ββ) e eterodimeri (αβ) nelle cellule gliali del sistema nervoso centrale e in alcune cellule periferiche come le cellule di Schwann, melanociti, adipociti, e condrociti (5).

S100αβ e S100ββ sono anche presenti nei tessuti maligni, in maggior modo nel melanoma e in misura minore nel glioma, nel carcinoma delle cellule tiroidee e nel carcinoma delle cellule renali (2).

La determinazione di S100B (come unità S100αβ e S100ββ) nel siero ha mostrato di essere clinicamente utile per la prognosi e il monitoraggio del trattamento dei pazienti con una diagnosi di melanoma maligno (6-9). Gli studi suggeriscono anche che S100B può essere utile per il management dei pazienti con danni al cervello ad es. per trauma da ferita alla testa, asfissia perinatale, arresto cardiaco, ictus e trauma dovuto a cardiocirurgia (10-13).

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il test S100B ELISA è basato sulla cattura in due fasi dell' S100B da parte di un anticorpo immobilizzato nella micropiastra e di un altro anticorpo coniugato con la perossidasi di rafano (HRP).

Il metodo è basato in due step distinti in ognuno dei quali, dopo un determinato periodo di incubazione, la separazione libero-legato si ottiene mediante semplice lavaggio della fase solida.

Infine l'enzima presente nella frazione legata, reagendo con il Substrato (H₂O₂) ed il TMB

Substrate, sviluppa una colorazione blu che vira al giallo dopo aggiunta dello Stop Solution (H₂SO₄). L'intensità del colore sviluppato è proporzionale alla concentrazione di S100B presente nel campione. La concentrazione dell'S100B nel campione è calcolata in base ad una curva di calibrazione.

3. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

3.1 Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibrators (6 flaconi, liofilizzati)

CAL0	REF DCE002/7406-0
CAL1	REF DCE002/7407-0
CAL2	REF DCE002/7408-0
CAL3	REF DCE002/7409-0
CAL4	REF DCE002/7410-0
CAL5	REF DCE002/7411-0

2. Controlli (2 flaconi, liofilizzati)

Controllo Negativo	REF DCE045/7401-0
Controllo Positivo	REF DCE045/7402-0

3. Conjugate buffer (1 flacone, 20 mL)

Tris buffer, BSA 10 g/L, tween 0,05%
REF DCE044-0

4. Conjugate (1 flacone, 1 mL)

Anticorpo anti S100B coniugato a perossidasi di rafano (HRP)
REF DCE002/7402-0

5. Assay buffer (1 flacone, 12 mL)

Tris buffer; BSA 10 g/L
REF DCE043-0

6. Coated microplate (1 micropiastra breakable)

Anticorpo anti S100B adsorbito sulla micropiastra
REF DCE002/7403-0

7. TMB Substrate (1 flacone, 15 mL)

H₂O₂-TMB 0.26 g/L (evitare il contatto con la pelle)
REF DCE004-0

8. Stop Solution (1 flacone, 15 mL)

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

9. 50X Conc. Wash Solution (1 flacone, 20 mL)

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

3.2 Reattivi necessari non forniti nel kit

Acqua distillata.

3.3 Materiale ausiliario e strumentazione

Dispensatori automatici.

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

Note

Conservare tutti i reattivi a 2-8°C, al riparo dalla luce. Aprire la busta del Reattivo 6 (Coated Microplate) solo dopo averla riportata a temperatura ambiente e chiuderla subito dopo il prelievo delle strips da utilizzare; una volta aperta è stabile fino alla data di scadenza del kit.

Evitare di staccare la sheet adesiva dalle strips 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 Sodio Mertioloato o 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 S100B da 10 pg/mL a 5000 pg/mL.

5. PRECAUZIONI

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

riportate sulle etichette della scatola e di tutte le fiale. Non utilizzare componenti oltre la data di scadenza.

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

6. PROCEDIMENTO

6.1. Preparazione del Campione

La determinazione della S100B può essere effettuata su siero o plasma umano. Non usare campioni emolizzati.

I campioni possono essere mantenuti a 2-8°C per 24 ore; per periodi più lunghi conservarli a -20°C. Evitare cicli ripetuti di congelamento scongelamento. Evitare di mantenere i campioni per lunghi periodi a temperatura ambiente.

Per campioni con concentrazione superiore a 5 ng/mL diluire il campione con Assay buffer.

6.2. Preparazione dei Calibratori e dei Controlli Ricostituire i Calibratori ed i Controlli con 1 mL di acqua distillata prima dell'uso.

Una volta ricostituiti rimangono stabili per circa 4 settimane a 2-8°C, circa 6 mesi se congelati a -20°C. Si consiglia di aliquotare il contenuto ricostituito in piccole aliquote da conservare a -20°C. Evitare cicli di scongelamento e lunghe esposizioni a temperatura ambiente (22-28°C).

La concentrazione dei Calibratori da riportare per il calcolo della retta è specifica per ogni lotto ed è indicata sull'etichetta di ogni flacone dei Calibratori e sul Certificato di Analisi.

6.3. Preparazione del Coniugato

Preparare 2 ore prima dell'uso

Aggiungere 50 µL di Conjugate (reattivo 4) a 1 mL di Conjugate Buffer (reattivo 3). La quantità di coniugato da preparare è proporzionale al numero dei test.

Mescolare delicatamente lasciando almeno 5 minuti su agitatore rotante. Stabile per 3 ore a temperatura ambiente (22-28°C).

6.4. Preparazione della Wash Solution

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

6.5. Procedimento

- **Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente (22-28°C) per almeno 30 minuti.** Al termine del dosaggio riporre immediatamente tutti i reagenti a 2-8°C: evitare lunghi periodi a temperatura ambiente.
- Le strisce di pozzetti non utilizzate devono essere rimesse immediatamente nella busta richiudibile contenente il materiale essicante e conservate a 2-8°C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche non rimettere i reagenti inutilizzati nei flaconi originali.
- Al fine di aumentare l'accuratezza dei risultati del test è necessario operare in doppio, allestendo due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni Controllo, due per ogni Campione ed uno per il Bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controlli	Bianco
Calibratore C ₀ -C ₅	50 µL		
Campione/ Controlli		50 µL	
Assay Buffer	50 µL	50 µL	
Incubare 2 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 6 volte con 300 µL di wash solution diluita. Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.			
Coniugato diluito	100 µL	100 µL	

Incubare 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C).

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti per 6 volte con 300 µL di wash solution diluita.

Nota importante: ad ogni step di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e successivamente rimuovere l'eccesso di soluzione di lavaggio sbattendo delicatamente la micropiastra capovolta su fogli di carta assorbente.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubare 30 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. RISULTATI

7.1 Estinzione Media

Calcolare l'estinzione media (Em) di ciascun punto della curva di calibrazione (C₀-C₅) e di ogni campione.

7.2 Curva di calibrazione

Tracciare il grafico dell'assorbanza (Em) in funzione delle concentrazioni dei Calibratori (C₀-C₅) disegnando la curva che meglio approssima il valore dei punti della curva di calibrazione (es.: Cubic Spline, Four parameter Logistic).

7.3 Calcolo dei Risultati

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

8. VALORI DI RIFERIMENTO

Ogni laboratorio dovrebbe stabilire il proprio range basandosi sulla popolazione dei pazienti.

Range di normalità: Media = 50 pg/mL SD =15 pg/mL

Range patologico: > 75 pg/mL

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

9. PARAMETRI CARATTERISTICI

9.1 Specificità

L'anticorpo riconosce specificamente la subunità β quindi reagisce contro le unità S100 $\alpha\beta$ e S100 $\beta\beta$, non è attivo contro l'unità S100 $\alpha\alpha$. Cross-reagisce con S100 bovina, suina, di coniglio, di gatto e di ratto; non cross-reagisce con altre proteine della famiglia EF-hand.

9.2 Sensibilità

La concentrazione minima misurabile di S100B che può essere distinta dal Calibratore 0 è 35,27 pg/mL.

9.3 Effetto Hook

In questo metodo, non è stato osservato effetto Hook fino a 5000 pg/mL di S100B.

10. DISPOSIZIONI PER LO SMALTIMENTO

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

11. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicenter study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Stigbrand T, Nyberg L, Ullen A, Haglid K, Sandstrom E, Brundell J. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):33-40.
15. Chen DQ, Zhu LL. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury.. *Chin J Traumatol*, 2005 Aug 1;8(4):245-8.
16. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80

BIBLIOGRAFIA

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.

Ed. 01/2015

DCM074-5

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM074-5
Ed. 01/2015

S100B ELISA

for routine analysis

Direct immunoenzymatic determination of S100B in human serum or plasma

IVD



LOT

See external label

2°C 8°C



Σ = 96 tests

REF DKO074

INTENDED USE

Immunoenzymatic colorimetric method for quantitative determination of S100B concentration in human serum or plasma.

S100B kit is intended for laboratory use only.

1. CLINICAL SIGNIFICANCE

S100 is a 20 kDa protein belonging to the S100/calmodulin/troponin C superfamily of EF-hand calcium-binding proteins. S100 was originally isolated from human brain and considered a glial-cell specific protein (1). Today, 20 monomers of the S100 family have been identified based on structural and functional similarities (2,3). Most of the S100 proteins exist as dimers and are expressed in a cell-specific manner. Two of the S100 monomers, designated S100α and S100β (4) are highly conserved between species and are found as homo- (ββ) and heterodimers (αβ) in central nervous system glial cells and in certain peripheral cells eg. Schwann cells, melanocytes, adipocytes, and chondrocytes (5). S100αβ and S100ββ are also present in malignant tissues, most notably in melanoma and to a lesser extent in glioma, thyroid cell carcinoma and renal cell carcinoma (2). Determination of S100B (like S100αβ and S100ββ units) in serum has been shown to be clinically useful for prognosis and treatment monitoring of patients diagnosed with malignant melanoma (6-9). Studies also suggest that S100B may be useful in the management of patients with brain damage from eg. traumatic head injury, perinatal asphyxia, cardiac arrest, cardiac surgery and stroke (10-13).

2. PRINCIPLE

S100B ELISA test is based on binding of S100B by two antibodies, one immobilized on microwell plates, and the other one conjugated with horseradish peroxidase (HRP). The assay is on two steps binding procedure and, after every incubation step, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue color that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The color intensity is proportional to the S100B concentration in the sample. S100B concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

3. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

3.1 Reagents and materials supplied in the kit.

- Calibrators** (6 vials, lyophilized)

CAL0	REF DCE002/7406-0
CAL1	REF DCE002/7407-0
CAL2	REF DCE002/7408-0
CAL3	REF DCE002/7409-0
CAL4	REF DCE002/7410-0
CAL5	REF DCE002/7411-0
- Controls** (2 vials, lyophilized)

Negative Control	REF DCE045/7401-0
Positive Control	REF DCE045/7402-0
- Conjugate buffer** (1 vial, 20 mL)
Tris buffer; BSA 10 g/L, tween 0.05%
REF DCE044-0
- Conjugate** (1 vial, 1 mL)
Anti S100B antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP)
REF DCE002/7402-0
- Assay buffer** (1 vial, 12 mL)
Tris buffer; BSA 10 g/L
REF DCE043-0
- Coated Microplate** (1 breakable microplate)
Anti S100B antibody adsorbed on microplate
REF DCE002/7403-0
- TMB Substrate** (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB 0.26 g/L (avoid any skin contact)
REF DCE004-0
- Stop Solution** (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15 mol/L (avoid any skin contact)
REF DCE005-0
- 50X Conc. Wash Solution** (1 vial, 20 mL)
NaCl 45g/L Tween-20 55g/L
REF DCE006-0

3.2 Necessary reagents not supplied with the kit

Distilled water.

3.3 Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser.

Microplates reader (450 nm, 620-630 nm)

Notes

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

Open the bag of reagent 6 (Coated Microplate) only when it is at room temperature and close it immediately after use; once opened it is stable at 2-8°C until the expiry date of the kit.

Do not remove the adhesive sheets on the strips unutilized.

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 Sodium Merthiolate or 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 S100B from 10 to 5000 pg/mL.

5. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated. The reagents are stable until the expiry date when stored and handled as indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If

more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate

- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

6. PROCEDURE

6.1 Preparation of the sample

The S100B determination can be carried out in human serum or plasma. Do not use hemolyzed samples.

Samples can be stored at 2÷8°C for 1 day; for long periods store at -20°C. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. Do not leave the samples at room temperature (22-28°C) for long period.

For sample with concentration over 5 ng/mL dilute the sample with Assay buffer

6.2 Preparation of the Calibrators and Controls

Reconstitute the Calibrators and Controls with 1 mL of distilled water before use.

Once reconstituted they are stable for 4 weeks at 2÷8°C and about six months if stored at -20°C. It is advised to aliquot the reconstituted content in small aliquots and store them at -20°C. Avoid repetitive freezing and thawing and long time exposure at room temperature (22-28°C).

The value of Calibrators concentration is lot specific and is reported on the Calibrators vial labels and on the Certificate of Analysis.

6.3 Preparation of the Conjugate

Prepare 2 hours before use.

Add 50 µL of Conjugate (reagent 4) to 1 mL of Conjugate Buffer (reagent 3). The quantity of diluted conjugate is proportional at the number of the tests. Mix gently for 5 minutes, with a rotating mixer. Stable for 3 hours at room temperature (22-28°C).

6.4 Preparation of the wash solution

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

6.5 Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, store immediately the reagents at 2-8°C: avoid long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Controls	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	50 µL		
Sample/ Controls		50 µL	
Assay Buffer	50 µL	50 µL	
Incubate 2 h at room temperature (22±28°C). Remove the content from each well, wash the wells 6 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.			
Diluted Conjugate	100 µL	100 µL	
Incubate 1 h at room temperature (22±28°C). Remove the content from each well, wash the wells 6 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.			
TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate 30 minutes at room temperature (22±28°C), 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. RESULTS

7.1 Mean Absorbance

Calculate the mean of the absorbencies (E_m) for each point of the calibration curve (C₀-C₅) and of each sample.

7.2 Calibration curve

Plot the values of absorbance (E_m) of the Calibrators (C₀-C₅) against concentration. Draw the best-fit curve through the plotted points (ex: Cubic spline or Four Parameter Logistic).

7.3 Calculation of Results

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

8. REFERENCES VALUES

Each laboratory must establish its own normal ranges based on patient population:

Normal range: Mean = 50 pg/mL SD = 15 pg/mL

Pathological limit: >75 pg/mL

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

9. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

9.1 Specificity

The antibody recognizes specifically the β subunit therefore reacts with S100αβ and S100ββ units, it is not reactive against the S100αα unit. Cross-reacts with S100 from bovine, porcine, rabbit cat and rat. Does not reacts with the other EF-hand family proteins.

9.2 Sensitivity

The lowest detectable concentration of S100B that can be distinguished from the Calibrator 0 is 35,27 pg/mL.

9.3 Hook Effect

In this assay, no hook effect is observed up to 5000 pg/mL of S100B

10. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed off in accordance with local

BIBLIOGRAPHY

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.
6. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicenter study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Stigbrand T, Nyberg L, Ullen A, Haglid K, Sandstrom E, Brundell J. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):33-40.
15. Chen DQ, Zhu LL. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury.. *Chin J Traumatol*, 2005 Aug 1;8(4):245-8.
16. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80

Ed. 01/2015

DCM074-5

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

Tel. +39-02-2139184

Fax +39-02-2133354

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

Tel. +39-0742-24851

Fax +39-0742-316197

E-mail: info@diametra.com



DCM074-5
Ed. 01/2015

S100B ELISA

para análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa de S100B en suero o plasma humano

IVD



LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C



Σ=96 ensayos

REF DKO074

USO PREVISTO

Método inmunoenzimático colorimétrico para la determinación cuantitativa de la concentración de S100B en suero o plasma humano.

El kit S100B ELISA está destinado al uso en laboratorio exclusivamente.

1. SIGNIFICADO CLÍNICO

La S100 es una proteína de 20 kDa que pertenece a la superfamilia S100/calmodulina/troponina C de las proteínas EF de unión de calcio. La S100 inicialmente se aisló del cerebro humano y se consideró como una proteína específica de las células gliales (1). Actualmente, se han identificado 20 monómeros de la familia S100 basándose en las semejanzas estructurales y funcionales (2,3). La mayor parte de las proteínas S100 existen como dímeros y tienen una expresión específica de células. Dos de los monómeros S100, S100α y S100β (4), están altamente conservados entre las especies y se encuentran como homodímeros (ββ) y heterodímeros (αβ) en las células gliales del sistema nervioso central y en algunas células periféricas, como las células de Schwann, melanocitos, adipocitos y condrocitos (5).

S100αβ y S100ββ también están presentes en los tejidos malignos, en mayor modo en el melanoma y en menor medida en el glioma, en el carcinoma de las células tiroideas y en el carcinoma de las células renales (2).

Se ha demostrado que la determinación de S100B (como unidad S100αβ y S100ββ) en suero es clínicamente útil para el pronóstico y la supervisión del tratamiento de los pacientes con un diagnóstico de melanoma maligno (6-9). Los estudios también sugieren que S100B puede ser útil para la gestión de los pacientes con daño cerebral, por ejemplo, trauma por lesión en la cabeza, asfixia perinatal, paro cardíaco, ictus y trauma debido a una cirugía cardíaca (10-13).

2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ENSAYO S100B ELISA se basa en la captura en dos fases de S100B por parte de un anticuerpo inmovilizado en la microplaca y otro anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP).

El método se basa en dos fases distintas, en cada una de las cuales, tras un determinado período de

incubación, la separación libre-unido se obtiene mediante un simple lavado de la fase sólida.

La enzima presente en la fracción unida, que reacciona con el sustrato (H_2O_2) y el sustrato TMB (TMB), desarrolla una coloración azul que cambia a amarillo tras la adición de la solución de interrupción (H_2SO_4).

La concentración de S100B en la muestra se calcula tomando como base una serie de Calibradores.

La intensidad del color desarrollado es proporcional a la concentración de S100B presente en la muestra.

3. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

3.1 Reactivos y materiales suministrados en el kit

1. Calibradores (6 frascos, liofilizados)

CAL0	REF DCE002/7406-0
CAL1	REF DCE002/7407-0
CAL2	REF DCE002/7408-0
CAL3	REF DCE002/7409-0
CAL4	REF DCE002/7410-0
CAL5	REF DCE002/7411-0

2. Controles (2 frascos, liofilizados)

Control negativo	REF DCE045/7401-0
Control positivo	REF DCE045/7402-0

3. Tampón de conjugado (1 frasco, 20 mL)

Tampón de Tris, BSA 10 g/L, tween 0,05%
REF DCE044-0

4. Conjugado (1 frasco, 1 mL)

Conjugado de anti-S100B-HRP
REF DCE002/7402-0

5. Tampón de ensayo (1 frasco, 12 mL)

Tampón de Tris; BSA 10 g/L, estabilizante
REF DCE043-0

6. Microplaca recubierta (1 microplaca rompible)

Anti-S100B absorbido en la microplaca
REF DCE002/7403-0

7. Sustrato TMB (1 frasco, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,25g/L (evitar el contacto con la piel)
REF DCE004-0

8. Solución de parada (1 frasco, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel)
REF DCE005-0

9. Solución de lavado conc. 50X (1 frasco, 20 mL)
NaCl 45g/L Tween-20 55g/L **REF DCE006-0**

3.2 Reactivos necesarios no suministrados en el kit

Agua destilada.

3.3 Material auxiliar e instrumentación

Dispensadores automáticos.

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

Nota

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

Abrir la bolsa del reactivo 6 (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 sodio mertiolato o 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 S100B de 10 pg/mL a 5000 pg/mL

5. PRECAUCIONES

- Respetar rigurosamente la secuencia de los pasos indicados en este protocolo. Los resultados aquí presentados se han obtenido utilizando los reactivos específicos que figuran en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse a una temperatura controlada de 2-8 °C en sus recipientes originales. Todas las excepciones están claramente marcados. Los reactivos son

estables hasta la fecha de caducidad cuando se almacenan y manipulan de acuerdo con las instrucciones proporcionadas.

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

6. PROCEDIMIENTO

6.1 Preparación de la muestra

La determinación de S100B puede realizarse en suero o plasma humano. No usar muestras hemolizadas.

Las muestras pueden conservarse a 2-8 °C durante 24 horas. Para períodos más largos, conservarlas a -20 °C. No congelar y descongelar las muestras repetidamente. Evitar mantener las muestras durante largos períodos a temperatura ambiente.

Para muestras con una concentración superior a 5 ng/mL, diluir la muestra con tampón de ensayo.

6.2 Preparación de los Calibradores y los controles

Reconstituir los Calibradores y los controles con 1 mL de agua destilada antes del uso.

Una vez reconstituidos, permanecen estables durante 4 semanas aproximadamente a 2-8°C, 6 meses aproximadamente si se congelan a -20°C; se recomienda conservar en alícuotas el contenido reconstituido. Evitar ciclos de descongelación y exposiciones prolongadas a temperatura ambiente (22-28 °C).

La concentración de los Calibradores que se debe usar para el cálculo de la recta es específica para cada lote y se indica en la etiqueta de cada frasco de Calibrador y en el certificado de calidad (Certificate of Analysis).

6.3 Preparación del conjugado

(Preparar 2 horas antes del uso)

Añadir 50 µl de conjugado (reactivo 4) a 1 mL de tampón de conjugado (reactivo 3). La cantidad de conjugado que se debe preparar es proporcional al número de ensayos.

Mezclar con cuidado dejando al menos 5 minutos en el agitador giratorio. Estable durante 3 horas a temperatura ambiente (22-28 °C).

6.4 Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del frasco de 50X Solución de lavado conc. (20 mL) a 1 L con agua destilada.

Para preparar volúmenes menores, respetar la relación de dilución de 1:50. La solución de lavado diluida se mantiene estable a 2-8°C durante al menos 30 días.

6.5 Procedimiento

- **Esperar hasta que todos los reactivos se encuentren a temperatura ambiente (22-28°C) durante al menos 30 minutos.** Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2-8°C para evitar largos periodos a temperatura ambiente.
- Las tiras de pocillos no utilizados se deben guardar de inmediato en la bolsa desechable que contiene desecantes y almacenarse a 2-8°C.
- Para evitar la contaminación microbiana y/o química no regrese porciones de reactivos no usados en los viales originales.
- Para aumentar la precisión de los resultados de la prueba es necesario trabajar en duplicado: preparar dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos para cada control, dos para cada muestra, uno para el blanco.

Reactivo	Calibrad.	Muestra/Controles	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	50 µL		
Muestra/Controles		50 µL	
Tampón de ensayo	50 µL	50 µL	
Incubar 2 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 6 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
Conjugado diluido	100 µL	100 µL	
Incubar 1 h a temperatura ambiente (22÷28°C). Retirar el contenido de cada pocillo y lavar los pocillos 6 veces con 300 µL de solución de lavado diluida. Nota importante: agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéela repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.			
Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
Incubar 30 minutos a temperatura ambiente (22÷28°C), protegida de la luz.			
Solución de parada	100 µL	100 µL	100 µL
Agitar la microplaca con cuidado. Leer la absorbancia (E) a 450 nm frente una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco dentro de los 5 minutos.			

7. RESULTADOS

7.1 Absorbancia media

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

7.2 Curva de calibración

Trazar el gráfico de la absorbancia en función de las concentraciones de los Calibradores (C₀-C₅) dibujando la curva que se aproxime mejor al valor de los puntos de la curva de calibración (p. ej.: modelo spline cúbico, logístico de cuatro parámetros).

7.3 Cálculo de los resultados

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

8. VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer su propio rango basándose en la población de los pacientes.

Rango de normalidad: Media = 50 pg/mL SD = 15 pg/mL

Rango patológico: > 75 pg/mL

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

9. PARÁMETROS CARACTERÍSTICOS

9.1 Especificidad

El anticuerpo reconoce específicamente la subunidad β y, por lo tanto, reacciona contra las unidades S100 $\alpha\beta$ y S100 $\beta\beta$; no es activo contra la unidad S100 $\alpha\alpha$. Reactividad cruzada con S100 bovina, porcina, de conejo, de gato y de rata. No se ha producido reactividad cruzada con otras proteínas de la familia mano EF.

9.2 Sensibilidad

La concentración mínima de S100B que se puede determinar con este ensayo es 35,27 pg/mL.

9.3 Limitaciones de uso

En este método no se ha observado efecto gancho hasta 5000 pg/mL de S100B

10. DISPOSICIONES PARA LA ELIMINACIÓN

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con las leyes locales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore BW (1965) A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 19:739-744.
2. Zimmer DB et al., (1995) The S100 protein family history, function and expression. *Brain Res Bull* 37:417-429.
3. Heizmann CW et al., (2002) S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci* 7:1356-1368.
4. Schäfer BW et al. (1995) Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics* 25:638-643.
5. Takahashi K et al., (1984) Immunohistochemical study on the distribution of α and β subunits of S-100 protein in human neoplasm and normal tissues. *Virchows Arch* 45:385-396.

6. Banfalvi T et al., (2003) Use of serum S-100B protein levels to monitor the clinical course of malignant melanoma. *Eur J Cancer* 39:164-169.
7. Djureen-Mårtensson E, et al., (2001) Serum S-100b protein as a prognostic marker in malignant cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:824-831.
8. Hauschild A et al., (1999) S100B protein detection in serum is significant prognostic factor in metastatic melanoma. *Oncology* 56:338-344.
9. Wunderlich MT et al., (1999) Early Neurobehavioral Outcome after stroke is related to release of neurobiochemical markers of brain damage. *Stroke* 30:1190-1195.
10. Martens P et al., (1998) Serum S100 and neuron specific enolase for prediction of regaining consciousness after global cerebral ischemia. *Stroke* 29:2363-2366.
11. Rosén H et al., (1998) Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 29: 473-477.
12. Ingebrigtsen T et al., (2000) The clinical value of serum S-100 protein measurements in minor head injury: a Scandinavian multicenter study. *Brain Inj* 14:1047-1055
13. Michetti F and Gazzolo D (2002) S100B protein in biological fluids: A tool for perinatal medicine *Clin Chem* 48:2097-2104
14. Stigbrand T, Nyberg L, Ullen A, Haglid K, Sandstrom E, Brundell J. A new specific method for measuring S-100B in serum. *Int J Biol Markers*. 2000 Jan-Mar;15(1):33-40.
15. Chen DQ, Zhu LL. Dynamic change of serum protein S100b and its clinical significance in patients with traumatic brain injury.. *Chin J Traumatol*, 2005 Aug 1;8(4):245-8.
16. Sawauchi S, Taya K, Murakami S, Ishi T, Ohtsuka T, Kato N, Kaku S, Tanaka T, Morooka S, Yuhki K, Urashima M, Abe T. Serum S-100B protein and neuron-specific enolase after traumatic brain injury. *No Shinkei Geka*. 2005 Nov;33(11):1073-80

Ed. 01/2015

DCM074-5

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

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

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

	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 Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo dia do mês)		DE ES FR GB IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR GB IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR GB IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR GB IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR GB IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR GB IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR GB IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR GB IT PT	Vor direkter sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

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

DiaMetra	Packaging Information Sheet	Mod. PIS000-1
-----------------	------------------------------------	----------------------

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