



## Instructions for Use

# Anti Zona Pellucida Ab ELISA



**REF** EIA-6138

 96



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

Distributed by:



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

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

### Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella die Contenuti

1	INTENDED USE.....	2
2	PRINCIPLE OF THE TEST.....	2
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS.....	3
4	REAGENTS.....	4
5	SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION.....	5
6	ASSAY PROCEDURE.....	5
7	EXPECTED NORMAL VALUES.....	7
8	QUALITY CONTROL.....	7
9	PERFORMANCE CHARACTERISTICS.....	7
10	LIMITATIONS OF USE.....	7
11	LEGAL ASPECTS.....	8

1	ZWECKBESTIMMUNG.....	9
2	TESTPRINZIP.....	9
3	VORSICHTSMAßNAHMEN.....	9
4	BESTANDTEILE DES KITS.....	10
5	PROBENVORBEREITUNG.....	11
6	TESTDURCHFÜHRUNG.....	11
7	ERWARTETE WERTE.....	13
8	QUALITÄTSKONTROLLE.....	13
9	ASSAY-CHARAKTERISTIKA.....	13
10	GRENZEN DES TESTS.....	13
11	RECHTLICHE GRUNDLAGEN.....	14

1	DESTINAZIONE D'USO.....	15
2	PRINCIPIO DEL TEST.....	15
3	PRECAUZIONI.....	15
4	COMPONENTI DEL KIT.....	16
5	CAMPIONI.....	17
6	ATTUAZIONE DEL TEST.....	17
7	VALORI NORMALI.....	19
8	CONTROLLO QUALITÀ.....	19
9	CARATTERISTICHE DEL TEST.....	19
10	LIMITAZIONE DEL TEST.....	19
11	ASPETTI LEGALI.....	20

12	REFERENCES / LITERATURE.....	21
----	------------------------------	----

	SYMBOLS USED.....	22
--	-------------------	----

## 1 INTENDED USE

The **DRG Anti Zona Pellucida Ab ELISA** is an enzyme immunoassay for the quantitative *in vitro* diagnostic measurement of antibodies directed against human zona pellucida in serum.

### 1.1 Information

Antibodies directed against zona pellucida antigens may cause infertility in women. The detection of the anti-zona pellucida antibodies may serve as an aid for the diagnosis of immunologically caused disorders of fertility.

## 2 PRINCIPLE OF THE TEST

The **DRG Anti Zona Pellucida Ab ELISA** is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) based on the **sandwich principle**.

The microtiter wells are coated with zona pellucida antigen.

During incubation, specific human anti-zona pellucida antibodies in the patient sample bind to the coated surface of the wells.

A washing step removes unbound sample components.

Added enzyme conjugate binds to the immobilized antibody-antigen-complexes.

The conjugate contains polyclonal antibodies directed against epitopes on the Fc part of human immunoglobulins and labelled with horseradish peroxidase (HRP).

After a washing step to remove all unbound substances, the solid phase is incubated with the substrate solution.

The colorimetric reaction is abruptly stopped by addition of stop solution and optical density (OD) of the resulting yellow product is measured.

The intensity of colour is proportional to the concentration of specific antibodies in the sample.

A standard curve is constructed by plotting OD values against concentrations of standards, and concentrations of unknown samples are determined using this standard curve.

**3 WARNINGS AND PRECAUTIONS**

1. This kit is for in vitro diagnostic use only. For professional use only.
2. All reagents of this test kit which contain human serum or plasma have been tested and confirmed negative for HIV I/II, HBsAg and HCV by FDA approved procedures. All reagents, however, should be treated as potential biohazards in use and for disposal.
3. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of instructions for use provided with the kit. Be sure that everything is understood.
4. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
5. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
6. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
7. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
8. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
9. Allow the reagents to reach room temperature (20 °C to 26 °C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the patient samples will not be affected.
10. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
11. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
12. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
13. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
14. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
15. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiter plate readers.
16. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
17. Avoid contact with Stop Solution containing 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. It may cause skin irritation and burns.
18. Some reagents contain Proclin 300, BND and/or MIT as preservatives. In case of contact with eyes or skin, flush immediately with water.
19. TMB substrate has an irritant effect on skin and mucosa. In case of possible contact, wash eyes with an abundant volume of water and skin with soap and abundant water. Wash contaminated objects before reusing them. If inhaled, take the person to open air.
20. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
21. For information on hazardous substances included in the kit please refer to Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from DRG.

## 4 REAGENTS

### 4.1 Reagents provided

1. **Microtiterwells**, 12 x 8 (break apart) strips, 96 wells;  
Wells coated with zona pellucida antigen.  
(incl. 1 cover foil)
2. **Standard (Standard 1 - 4)**, 4 vials, 0.5 mL each, ready to use;  
Concentrations: 6 – 25 – 50 – 100 U/mL  
Contain non-mercury preservative.
3. **Quality Control**, 1 vial, 0.5 mL each, ready to use;  
For control values and ranges please refer to vial label or QC-Datasheet.  
Contain non-mercury preservative.
4. **Dilution Buffer / Zero Standard**, 1 vial, 50 mL, ready to use;  
Concentration: 0 U/mL  
Contains non-mercury preservative.
5. **Enzyme Conjugate**, 1 vial, 6 mL, ready to use;  
Anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase;  
Contains non-mercury preservative.
6. **Substrate Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
Tetramethylbenzidine (TMB).
7. **Stop Solution**, 1 vial, 14 mL, ready to use;  
Contains 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.  
Avoid contact with the stop solution. It may cause skin irritations and burns.
8. **Wash Solution**, 1 vial, 30 mL (40X concentrated);  
See "Reagent Preparation".

### 4.2 Materials required but not provided

- A calibrated microtiter plate reader (450 nm, with reference wavelength at 620 nm to 630 nm) (e.g. the DRG Instruments Microtiter Plate Reader)
- Calibrated variable precision micropipettes
- Tubes for sample dilution
- Absorbent paper
- Distilled water
- Timer
- Graph paper or software for data reduction

### 4.3 Storage Conditions

When stored at 2 °C to 8 °C unopened reagents will retain reactivity until expiration date. Do not use reagents beyond this date.

Opened reagents must be stored at 2 °C to 8 °C. Microtiter wells must be stored at 2 °C to 8 °C. Once the foil bag has been opened, care should be taken to close it tightly again.

Opened kits retain activity for 4 weeks if stored as described above.

### 4.4 Reagent Preparation

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

#### **Wash Solution**

Add distilled water to the 40X concentrated Wash Solution.

Dilute 30 mL of concentrated *Wash Solution* with 1170 mL distilled water to a final volume of 1200 mL.

*The diluted Wash Solution is stable for 2 weeks at room temperature.*

#### 4.5 Disposal of the Kit

The disposal of the kit and all used materials/reagents must be performed according to the national regulations. Special information for this product is given in the Safety Data Sheet, section 13.

#### 4.6 Damaged Test Kits

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

### 5 SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

Serum can be used in this assay.

*Note:* Samples containing sodium azide should not be used in the assay.  
In general, it should be avoided to use haemolytic, icteric, or lipaemic specimens.

#### 5.1 Specimen Collection

##### Serum:

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

#### 5.2 Specimen Storage and Preparation

Specimens should be capped and may be stored for up to 7 days at 2 °C to 8 °C prior to assaying. Specimens held for a longer time (up to 12 months) should be frozen only once at -20 °C prior to assay. Thawed samples should be inverted several times prior to testing.

#### 5.3 Specimen Dilution

Prior to assaying, dilute each patient specimen **1 / 100** with *Dilution Buffer*.

##### Example:

Dilution 1:100: 5 µL sample + 495 µL *Dilution Buffer* (mix thoroughly)

**Note:** The *Quality Control* is ready to use and must not be diluted!

### 6 ASSAY PROCEDURE

#### 6.1 General Remarks

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

## 6.2 Test Procedure

Each run must include a standard curve.

1. Secure the desired number of Microtiter wells in the frame holder.
2. Dispense **50 µL** each of **Zero Standard**, **Standard**, **Quality Control** and **diluted samples with new disposable tips** into appropriate wells.
3. Cover with foil and incubate for **60 minutes** at **37 °C**.
4. Rinse the wells **3 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well, if a plate washer is used.  
- OR -  
Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **3 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.  
**Important note:**  
The sensitivity and precision of this assay is markedly influenced by the correct performance of the washing procedure!
5. Dispense **50 µL Enzyme Conjugate** into each well.  
Thoroughly mix for 10 seconds. It is important to have a complete mixing in this step.
6. Cover with foil and incubate for **60 minutes** at **37 °C**.
7. Rinse the wells **5 times** with **400 µL** diluted *Wash Solution* per well, if a plate washer is used.  
- OR -  
Briskly shake out the contents of the wells.  
Rinse the wells **5 times** with **300 µL** diluted *Wash Solution* per well for manual washing. Strike the wells sharply on absorbent paper to remove residual droplets.
8. Add **50 µL** of **Substrate Solution** to each well.
9. Incubate for **30 minutes** at room temperature.
10. Stop the enzymatic reaction by adding **50 µL** of **Stop Solution** to each well.
11. Determine the absorbance (OD) of the solution in each well at **450 nm (reading) and at 620 nm to 630 nm (background subtraction, recommended)** with a microtiter plate reader.  
It is recommended that the wells be read **within 10 minutes** after adding the *Stop Solution*.

## 6.3 Calculation of Results

1. Calculate the average absorbance values for each set of standards, controls and patient samples.
2. Using graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample determine the corresponding concentration from the standard curve.
4. Automated method: The results in the Instructions for Use have been calculated automatically using a 4-Parameter curve fit. (4 Parameter Rodbard or 4 Parameter Marquardt are the preferred methods.) Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be read directly from this standard curve.

The standards are already pre-diluted, therefore the 1/100 dilution of the samples must not be taken into account for the final calculation of sample concentrations.

### 6.3.1 Example of Typical Standard Curve

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

Standard	Optical Units (450 nm)
Zero Standard	0.03
Standard 1	0.42
Standard 2	1.08
Standard 3	1.69
Standard 4	2.40

## 7 EXPECTED NORMAL VALUES

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

Normal values	0 - 10 U/mL
Elevated values	> 10 U/mL

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

## 8 QUALITY CONTROL

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

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

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

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

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

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

## 9 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

### 9.1 Intra-assay

Mean CV: 6.8% (range from 5.1% – 7.9 %)

For the determination of the intra-assay precision, 6 kits from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (OD > 1.0) was applied 96 times per testing procedure.

### 9.2 Inter-assay

Mean CV: 7.2% (range from 5.5% – 9.0 %)

For the determination of the inter-assay variation coefficient one strip each of 12 kits stemming from 6 different batches (produced on different days) were used. One patient sample (OD > 1.0) was applied 72 times per testing procedure.

## 10 LIMITATIONS OF USE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice.

Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

### 10.1 Interfering Substances

Severely haemolytic or lipaemic sera or sera from patients with liver diseases should not be used.

Results may be adversely affected by certain pathologic conditions, such as poly- and monoclonal gammopathies, autoimmune diseases or by an altered immune status.



## **11 LEGAL ASPECTS**

### **11.1 Reliability of Results**

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DRG.

### **11.2 Therapeutic Consequences**

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 11.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

### **11.3 Liability**

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 11.2 are also invalid.

Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

## 1 ZWECKBESTIMMUNG

Der **DRG Anti Zona Pellucida Ab ELISA** wird zur quantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen humanes Zona-Pellucida-Antigen in Serum eingesetzt.

**Nur für *In-vitro* Diagnostik.**

### 1.1 Information

Antikörper, die gegen Zona Pellucida-Antigene gerichtet sind, können Unfruchtbarkeit bei Frauen verursachen. Der Nachweis von Anti-Zona-Pellucida-Antikörpern kann als Hilfsmittel für die Diagnose von immunologisch bedingten Fruchtbarkeitsstörungen dienen.

## 2 TESTPRINZIP

Der DRG **Anti Zona Pellucida Ab ELISA** ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf der **Sandwichtechnik** basiert. Die Wells der Mikrotiterplatte sind mit Zona Pellucida-Antigen beschichtet.

Während der Inkubation binden sich spezifische menschliche Anti-Zona-Pellucida-Antikörper in der Patientenprobe an die beschichtete Oberfläche der Vertiefungen.

In einem Waschschrift werden ungebundene Probenbestandteile entfernt.

Zugegebenes Enzymkonjugat bindet an die immobilisierten Antikörper-Antigen-Komplexe.

Das Konjugat enthält polyklonale Antikörper, die gegen Epitope auf dem Fc-Teil der menschlichen Immunglobuline gerichtet und mit Meerrettichperoxidase (HRP) markiert sind.

Nach einem Waschschrift, um alle ungebundenen Substanzen zu entfernen, wird die feste Phase mit der Substratlösung inkubiert. Die Farbreaktion wird durch die Zugabe der Stopplösung beendet und die optische Dichte (OD) des resultierenden gelben Produktes gemessen. Die Intensität der Farbe ist proportional zur Konzentration des spezifischen Antikörper in der Probe.

Durch Auftragen der OD-Werte gegen die Konzentrationen der Standards wird eine Standardkurve erstellt, und die Konzentrationen der unbekanntenen Proben werden anhand dieser Standardkurve bestimmt.

## 3 VORSICHTSMAßNAHMEN

- Dieser Kit ist nur zum *in vitro* diagnostischen Gebrauch geeignet.
- Nur die gültige, im Testkit enthaltene, Gebrauchsanweisung verwenden.
- Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Sicherheitsdatenblatt.
- Alle Bestandteile dieses Testkits, die humanes Serum oder Plasma enthalten, wurden mit FDA-geprüften Methoden auf HIV I/II, HbsAg und HCV getestet und als negativ bestätigt. Jedoch sollten alle Bestandteile im Umgang und bei der Entsorgung wie mögliche Gefahrenstoffe betrachtet werden.
- Der Kontakt mit der *Stop Solution* sollte vermieden werden, da sie 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> enthält. Schwefelsäure kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
- In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
- Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
- Der Gebrauch sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
- Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
- Alle im Kit-Protokoll angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
- Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen. Es wird empfohlen, keine Wells von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristik der Platten leicht unterschiedlich ausfällt.
- Chemikalien und zubereitete oder bereits benutzte Reagenzien müssen gemäß den nationalen Gefahrenstoffvorschriften wie gefährlicher Abfall behandelt werden.
- Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma DRG Instruments GmbH erhältlich.

## 4 BESTANDTEILE DES KITS

### 4.1 Kitinhalt

1. **Microtiterwells**, 96 Wells, 12 x 8 Wells (einzeln brechbar);  
Mit anti Zona Pellucida-Antigen beschichtet.  
(inkl. 1 Abdeckfolie)
2. **Standard (Standard 1 - 4)**, 4 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentrationen: 6 – 25 – 50 – 100 U/mL  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
3. **Quality Control** (Kontrolle), 1 Fläschchen, je 0,5 mL, gebrauchsfertig;  
Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem Fläschchenetikett oder dem QC-Datenblatt.  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
4. **Dilution Buffer / Zero Standard** (Probenverdünnungsmedium / Nullstandard),  
1 Fläschchen, 50 mL, gebrauchsfertig;  
Konzentration: 0 U/mL  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
5. **Enzyme Conjugate** (Enzymkonjugat), 1 Fläschchen, 6 mL, gebrauchsfertig;  
Anti-Human-IgG-Antikörper mit Meerrettichperoxidase konjugiert;  
Enthält quecksilberfreies Konservierungsmittel.
6. **Substrate Solution** (Substratlösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
Substratlösung TMB.
7. **Stop Solution** (Stopplösung), 1 Fläschchen, 14 mL, gebrauchsfertig;  
enthält 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,  
Kontakt mit der Stopplösung vermeiden! Kann Hautreizungen und Verbrennungen verursachen.
8. **Wash Solution** (Waschlösung), 1 Fläschchen, 30 mL, **40X** konzentriert;  
Siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

### 4.2 Erforderliche aber nicht enthaltene Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplattenlesegerät (450 nm, mit Referenzwellenlänge bei 620 nm bis 630 nm), (z.B. das DRG Instruments Mikrotiterplattenlesegerät)
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten
- Röhrchen zur Probenverdünnung
- Saugfähiges Papier
- Destilliertes Wasser
- Laborwecker
- Millimeterpapier oder Software zur Datenauswertung

### 4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2 °C bis 8 °C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden.

Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden.

Die Mikrotiterwells sollten bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden. Unter den beschriebenen Lagerbedingungen behalten geöffnete Kits 4 Wochen ihre Reaktivität.

### 4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Wells sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (20 °C bis 26 °C) gebracht werden.

#### **Wash Solution**

Die 40-fach konzentrierte *Wash Solution* (30 mL) mit 1170 mL destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1200 mL verdünnen.

*Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur für 2 Wochen stabil.*

#### 4.5 Entsorgung des Kits

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

#### 4.6 Beschädigte Testkits

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

### 5 PROBENVORBEREITUNG

Serum kann in diesem Test als Probenmaterial eingesetzt werden.

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

Generell sollte die Verwendung von hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben vermieden werden.

#### 5.1 Probenentnahme

##### Serum:

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

#### 5.2 Probenaufbewahrung

Proben sollten stets gut verschlossen sein und können vor Testbeginn bis zu 7 Tage bei 2 °C bis 8 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung (bis zu 12 Monaten) sollten die Proben eingefroren bei -20 °C bis zum Testbeginn gelagert werden. Nur einmal einfrieren. Aufgetaute Proben sollten vor Testbeginn vorsichtig durchmischt werden, ohne Schaumbildung.

#### 5.3 Probenverdünnung

Vor Einsatz im Test müssen die Patientenproben **1 / 100** mit *Dilution Buffer* verdünnt werden.

##### Beispiel:

Verdünnung 1:100: 5 µL Probe + 495 µL *Dilution Buffer* gründlich mischen)

**Beachten:** Die Kontrolle (*Quality Control*) ist gebrauchsfertig und muss nicht verdünnt werden.

### 6 TESTDURCHFÜHRUNG

#### 6.1 Allgemeine Hinweise

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

## 6.2 Testdurchführung

Jeder Lauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl Wells in der Halterung befestigen.
2. Je **50 µL Zero Standard, Standard, Quality Control** und **verdünnte Probe mit neuen Plastikspitzen** in die entsprechenden Wells geben.
3. Mit Folie abdecken und **60 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
4. Wells **3-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.  
- ODER -  
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **3-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung.  
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.  
**Achtung:** Die Sensitivität und Präzision dieses Assays wird erheblich beeinflusst von der korrekten Durchführung des Waschschrilles!
5. **50 µL Enzyme Conjugate** in jedes Well geben.  
Für 10 Sekunden gut schütteln. Es ist sehr wichtig, in diesem Schritt eine komplette Durchmischung zu erreichen.
6. Mit Folie abdecken und **60 Minuten** bei **37 °C** inkubieren.
7. Wells **5-mal** mit **400 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen, falls ein Waschautomat verwendet wird.  
- ODER -  
Den Inhalt der Wells kräftig ausschütteln.  
Wells **5-mal** mit **300 µL** verdünnter *Wash Solution* waschen bei manueller Durchführung.  
Verbleibende Flüssigkeit durch Ausklopfen der Wells auf saugfähigem Papier entfernen.
8. **50 µL Substrate Solution** in jedes Well geben.
9. **30 Minuten** bei Raumtemperatur inkubieren.
10. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µL Stop Solution** in jedes Well abstoppen.
11. Die Optische Dichte (OD) bei **450 nm (Messung) und 620 nm bis 630 nm (Abzug des Hintergrundes, empfohlen)** mit einem Mikrotiterplattenleser innerhalb von **10 Minuten** nach Zugabe der *Stop Solution* bestimmen.

## 6.3 Ergebnisermittlung

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

Die Standards sind bereits vorverdünnt, daher darf die 1/100 Verdünnung der Proben bei der endgültigen Berechnung der Probenkonzentrationen nicht berücksichtigt werden.

### 6.3.1 Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450 nm)
Zero Standard	0.03
Standard 1	0.42
Standard 2	1.08
Standard 3	1.69
Standard 4	2.40

## 7 ERWARTETE WERTE

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

Normalwerte	0 - 10 U/mL
Erhöhte Werte	> 10 U/mL

Die mit diesem Testkit erzielten Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für therapeutische Konsequenzen dienen. Die Ergebnisse müssen zusammen mit anderen klinischen Befunden und diagnostischen Tests des Patienten interpretiert werden.

## 8 QUALITÄTSKONTROLLE

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

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

Es sollten geeignete statistische Methoden zur Analyse von Kontroll-Werten und Trends angewendet werden. Wenn die Ergebnisse des Assays nicht mit den angegebenen Akzeptanzbereichen des Kontrollmaterials übereinstimmen, sollten die Patientenergebnisse als ungültig eingestuft werden.

In diesem Fall überprüfen Sie bitte die folgenden Bereiche: Pipetten und Zeitnehmer, Photometer, Verfallsdatum der Reagenzien, Lagerungs- und Inkubationsbedingungen, Absaug- und Waschmethode.

Sollten Sie nach Überprüfung der vorgenannten Bereiche keinen Fehler erkannt haben, setzen Sie sich bitte mit Ihrem Lieferanten oder direkt mit der Firma DRG in Verbindung.

## 9 ASSAY-CHARAKTERISTIKA

### 9.1 Intra-Assay

Mittlerer VK: 6,8% (Bereich von 5,1% – 7,9%)

Zur Bestimmung der Intra-Assay-Präzision wurden sechs Kits von sechs verschiedenen Chargen, die an unterschiedlichen Tagen produziert wurden, verwendet. Eine Patientenprobe (OD > 1,0) wurde 96-mal pro Testdurchlauf verwendet.

### 9.2 Inter-Assay

Mittlerer VK: 7,2% (5,5 – 9,0%)

Zur Bestimmung der Inter-Assay-Präzision wurde jeweils ein Streifen von 12 Kits, die von sechs verschiedenen, an unterschiedlichen Tagen produzierten Chargen stammten, verwendet. Eine Patientenprobe (OD > 1,0) wurde 72-mal pro Testdurchlauf verwendet.

## 10 GRENZEN DES TESTS

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

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

### 10.1 Interferenzen

Stark hämolytische oder lipämische Seren oder Seren von Patienten mit Leberkrankheiten sollten nicht verwendet werden.

Die Ergebnisse können durch bestimmte pathologische Zustände, wie poly- und monoklonale Gammopathien, Autoimmunerkrankungen oder durch einen veränderten Immunstatus beeinträchtigt werden.

## **11 RECHTLICHE GRUNDLAGEN**

### **11.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse**

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DRG in Verbindung.

### **11.2 Therapeutische Konsequenzen**

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 11.1 genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten.

Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden.

Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

### **11.3 Haftung**

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 11.2 erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

## 1 DESTINAZIONE D'USO

Il test immuno-enzimatico **DRG Anti Zona Pellucida Ab ELISA** contiene materiale per la determinazione quantitativa degli anticorpi diretti contro gli antigeni della zona pellucida nel siero.

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

### 1.1 Informazioni

Gli anticorpi diretti contro gli antigeni della zona pellucida possono causare infertilità nelle donne. La determinazione degli anticorpi anti-zona pellucida può servire come aiuto per la diagnosi di disturbi della fertilità causati immunologicamente.

## 2 PRINCIPIO DEL TEST

Il test kit DRG Anti Zona Pellucida Ab ELISA è un test immunologico in fase solida con enzimi ancorati su un substrato (ELISA) basato sul **principio sandwich**.

I micropozzetti sono ricoperti con antigeni della zona pellucida. Durante l'incubazione, gli anticorpi specifici anti-zona pellucida umani nel campione del paziente si legano alla superficie rivestita dei pozzetti.

Una fase di lavaggio rimuove i componenti del campione non legati.

Il coniugato enzimatico aggiunto si lega ai complessi anticorpo-antigene immobilizzato. Il coniugato contiene anticorpi policlonali diretti contro gli epitopi sulla parte Fc delle immunoglobuline umane e coniugati con perossidasi di rafano (HRP).

Dopo una fase di lavaggio per rimuovere tutte le sostanze non legate, la fase solida viene incubata con la soluzione di substrato. La reazione colorimetrica viene bruscamente interrotta con l'aggiunta di soluzione di arresto e viene misurata la densità ottica (OD) del prodotto giallo risultante.

L'intensità del colore è proporzionale alla concentrazione di anticorpi specifici nel campione.

Una curva standard viene costruita tracciando i valori di OD rispetto alle concentrazioni di standard, e le concentrazioni di campioni sconosciuti vengono determinate usando questa curva standard.

## 3 PRECAUZIONI

- Questo kit è adatto soltanto per l'uso diagnostico in vitro.
- Si prega di usare la versione valida dell'inserito del pacco a disposizione con il kit.
- Informazioni su sostanze pericolose contenute nel kit sono riportate nel regolamento di sicurezza.
- Tutti i componenti del kit che contengono siero o plasma umano sono controllati e confermati negativi per la presenza di HIV I/II, HbsAg e HCV con metodi conformi alle norme FDA. Ciononostante tutti i componenti dovrebbero essere trattati come potenziali sostanze nocive nella manutenzione e nello smaltimento.
- Il contatto con la *Stop Solution* dovrebbe essere evitato perché contiene 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'acido solforico può provocare irritazioni cutanee e ustioni.
- Non pipettare con la bocca ed evitare il contatto con componenti del kit con la pelle o con le mucose.
- Nelle aree in cui il test viene utilizzato non fumare, mangiare, bere o fare uso di prodotti cosmetici.
- Nella manutenzione dei campioni o reagenti del kit portare guanti di latex monouso. La contaminazione dei reagenti o dei campioni con microbi può dare risultati falsi.
- L'utilizzo dovrebbe avvenire secondo regole che seguono le rispettive norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- Non utilizzare i reagenti dopo la scadenza indicata sul kit.
- Ogni indicazione sulla quantità indicata del protocollo del kit deve essere accuratamente seguito. Risultati ottimali possono essere ottenuti soltanto con l'uso di pipette calibrate e spettrofotometro calibrato.
- Componenti del kit con numeri di lotto diversi non devono essere combinati. È consigliabile di non utilizzare pozzetti di piastre diversi, anche se si tratta dello stesso lotto. I kit potrebbero essere stati magazzinati o spediti a condizioni diverse, cosicché le caratteristiche di legame potrebbero divergere leggermente.
- I componenti chimici e reagenti preparati o già utilizzati devono essere trattati e smaltiti secondo le norme di sicurezza nazionali sulle sostanze nocive.
- I regolamenti di sicurezza di questo prodotto possono essere richiesti direttamente dalla ditta DRG Instruments GmbH.



## 4 COMPONENTI DEL KIT

### 4.1 Contenuto del kit

1. **Microtiterwells** (Micropozetti), 12 x 8 file (separatamente staccabili), 96 pozzetti; Pozzetti ricoperti con antigeni della zona pellucida; (incluso 1 foglio di copertura)
2. **Standard (Standard 1 - 4)**, 4 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; Concentrazione: 6 – 25 – 50 – 100 U/mL; Contiene conservante senza mercurio.
3. **Quality Control** (Controllo), 1 flaconi, 0,5 mL ognuno, pronto all'uso; I valori dei controlli sono indicati sull'etichetta dei flaconi o sulla descrizione QC. Contiene conservante senza mercurio.
4. **Dilution Buffer / Zero Standard** (Diluyente dei campioni / Standard zero), 1 flacone, 50 mL, pronto all'uso; Concentrazione: 0 U/mL Contiene conservante senza mercurio.
5. **Enzyme Conjugate** (Tracciante enzimatico), 1 flacone, 6 mL, pronto all'uso; Anticorpo IgG anti-umano coniugato alla perossidasi di rafano. Contiene conservante senza mercurio.
6. **Substrate Solution** (Soluzione di substrato), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; TMB (benzidine tetrametilico).
7. **Stop Solution** (Soluzione d'arresto), 1 flacone, 14 mL, pronto all'uso; Contiene 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Evitare il contatto con la soluzione d'arresto. Può causare irritazioni cutanee e ustioni.
8. **Wash Solution** (Soluzione di lavaggio), 1 flacone, 30 mL (concentrata 40X); vedi „preparazione dei reagenti“.

### 4.2 Materiali richiesti ma non contenuti nel kit

- Lettore di piastre di microtitolazione calibrato (450 nm, con lunghezza d'onda di riferimento a 620 nm a 630 nm) (p.es. il DRG Instruments Microtiterplate Reader)
- Micropipette calibrate di precisione a volume variabile
- Tubi per la diluizione del campione
- Carta assorbente
- Acqua distillata
- Timer
- Carta millimetrata o software per il calcolo dei dati

### 4.3 Magazzinaggio e stabilità del kit

A 2 °C a 8 °C i reagenti non aperti rimangono reattivi fino alla data di scadenza indicata. Non usare reagenti oltre questa data.

Tutti i reagenti aperti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. I micropozzetti devono essere magazzinati a 2 °C a 8 °C. Una volta aperti i pacchi, questi devono essere richiusi accuratamente.

Test kits aperti rimangono attivi per 4 settimane se magazzinati alle condizioni sopra descritte.

### 4.4 Preparazione dei reagenti

Prima dell'uso portare tutti i reagenti e il numero necessario di pozzetti a temperatura ambiente (20 °C a 26 °C).

#### **Wash Solution**

Diluire 30 mL *Wash Solution* concentrata con 1170 mL di acqua distillata fino ad un volume finale di 1200 mL.

*La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 2 settimane a temperatura ambiente.*

### 4.5 Smaltimento del kit

La discarica del kit e di tutti i materiali/reagenti usati devono avvenire secondo i regolamenti nazionali. Informazioni aggiuntive per questo prodotto si trovano nella scheda di dati di sicurezza, capitolo 13.

#### 4.6 Test kits danneggiati

In caso di alcun danno al test kit o ai suoi componenti, DRG deve essere informato per iscritto, al Massimo una settimana dopo la ricevuata del kit. Componenti singoli danneggiati non devono essere usati per un saggio. Questi devono essere conservati fino ad aver trovato una soluzione finale. Dopo, questi componenti devono essere scaricati secondo i regolamenti ufficiali.

### 5 CAMPIONI

Il siero può essere usato per questo test.

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

In generale si dovrebbe evitare l'uso di campioni emolitici, itterici o lipemici.

#### 5.1 Collezione dei campioni

##### Siero:

Collezionare sangue tramite puntura venale (p.es. Sarstedt Monovette per siero), far coagulare e separare il siero centrifugando a temperatura ambiente.

Non centrifugare prima che la coagulazione sia completata. Campioni di pazienti con una terapia anticoagulante possono richiedere più tempo per la coagulazione.

#### 5.2 Magazzinaggio dei campioni

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

Campioni magazzinati per un periodo più lungo (fino a 12 mesi) dovrebbero essere congelati solo una volta a -20 °C prima dell'analisi. Congelare soltanto una volta. Invertire campioni scongelati alcune volte prima dell'uso.

#### 5.3 Diluizione dei campioni

Prima del dosaggio, diluire ogni campione paziente **1 / 100** con il tampone di diluizione.

##### Esempio:

diluizione 1:100:        5 µL campione + 495 µL *Dilution Buffer* (miscelare accuratamente)

**Nota:** Il controllo (*Quality Control*) è pronto all'uso e non deve essere diluito!

### 6 ATTUAZIONE DEL TEST

#### 6.1 Indicazioni generali

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

## 6.2 Eseguito del test

Ogni analisi deve includere una curva standard.

1. Fissare i pozzetti necessari sul supporto.
2. Pipettare **50 µL** ciascuno di **Zero Standard, Standard, Quality Control** e **campioni diluiti** nei pozzetti appropriati, cambiando ogni volta la punta monouso.
3. Coprire con un foglio e incubare per **60 minuti** a **37 °C**.
4. Lavare i pozzetti **3 volte** con **400 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.  
- OPPURE -  
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti **3 volte** con **300 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.  
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.  
**Importante:**  
La sensibilità e la precisazione di questo kit sono fortemente influenzate dal corretto eseguito del lavaggio!
5. Pipettare **50 µL Enzyme Conjugate** in ogni pozzetto.  
Agitare bene per 10 secondi. È molto importante raggiungere un completo mescolamento.
6. Coprire con un foglio e incubare per **60 minuti** a **37 °C**.
7. Lavare i pozzetti **3 volte** con **400 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto, se si utilizza una piastra di lavaggio.  
- OPPURE -  
Rovesciare la piastra per vuotare i pozzetti.  
Lavare i pozzetti **3 volte** con **300 µL Wash Solution** diluita in ogni pozzetto per il lavaggio manuale.  
Rimuovere le gocce d'acqua rimanenti rivoltando la piastra su carta assorbente.
8. Aggiungere **50 µL** della **Substrate Solution** ad ogni pozzetto.
9. Incubare per **30 minuti** a temperatura ambiente.
10. Fermare la reazione enzimatica aggiungendo **50 µL** della **Stop Solution** ad ogni pozzetto.
11. Determinare la densità ottica (OD) della soluzione in ogni pozzetto **a 450 nm (lettura) e a 620 nm a 630 nm (sottrazione dello sfondo, raccomandata)** con un lettore di piastre di microtitolazione.  
Si raccomanda di leggere i pozzetti entro **10 minuti** dall'aggiunta della **Stop Solution**.

## 6.3 Rilevamento dei risultati

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

Gli standard sono già pre-diluiti, pertanto la diluizione 1/100 dei campioni non deve essere presa in considerazione per il calcolo finale delle concentrazioni dei campioni.

### 6.3.1 Esempio di una curva standard tipica

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

Standard	Densità ottiche (450 nm)
Zero Standard	0.03
Standard 1	0.42
Standard 2	1.08
Standard 3	1.69
Standard 4	2.40

## 7 VALORI NORMALI

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

Valori normali 0 - 10 U/mL

Valori elevati > 10 U/mL

Come per tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva **non** dovrebbe basarsi sui risultati di un singolo dosaggio. Una diagnosi clinica dovrebbe essere formulata dal medico in seguito ad un'attenta valutazione di tutti gli aspetti clinici assieme ai dati di laboratorio.

## 8 CONTROLLO QUALITÀ

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

Le referenze con i rispettivi risultati del laboratorio QC sono elencati nel QC certificato, che è allegato al kit. I valori riportati nel QC certificato si riferiscono al lotto del kit attuale e dovrebbero essere utilizzati per un raffronto dei risultati. Appropriati metodi statistici per l'analisi dei valori controllo e delle rappresentazioni grafici dovrebbero essere adoperati. Nel caso che i risultati del test non combaciano con il campo di accettazione indicato dal materiale di controllo, i risultati dei pazienti devono essere considerati invalidi. In questo caso si prega di controllare i seguenti fattori d'errore: pipette, cronometri, fotometro, data di scadenza dei reagenti, condizione di magazzinaggio e d'incubazione, metodi di aspirazione e di lavaggio.

Se dopo il controllo dei suddetti fattori non è rilevabile alcun errore, si prega di contattare il fornitore o direttamente la ditta DRG.

## 9 CARATTERISTICHE DEL TEST

### 9.1 Intra-test

CV medio: 6.8% (intervallo 5.1% – 7.9 %)

Per la determinazione della precisione intra-saggio sono stati utilizzati 6 kit di 6 differenti lotti (prodotti in giorni differenti). Un campione di paziente (densità ottica circa 1.0) è stato dosato 96 volte per ogni serie analitica.

### 9.2 Inter-test

CV medio: 7.2% (intervallo 5.5 – 9.0 %)

Per la determinazione della precisione inter-saggio è stata utilizzata una striscia per ognuno di 12 kit provenienti da 6 lotti diversi (prodotti in giorni differenti). Un campione di paziente (densità ottica circa 1.0) è stato dosato 72 volte per ogni serie analitica.

## 10 LIMITAZIONE DEL TEST

Risultati affidabili e riproducibili saranno ottenuti quando il procedimento del test è seguito con una comprensione completa delle istruzioni all'uso e seguendo una buona pratica di laboratorio (GLP).

Ogni manutenzione impropria dei campioni o modificazione al saggio può influenzare i risultati.

### 10.1 Sostanze interferenti

Sieri gravemente emolitici o lipemici o sieri da pazienti con patologia epatiche non devono essere analizzati.

I risultati potrebbero essere sensibilmente alterati da certe condizioni patologiche, quali le gammopatie poli- e monoclonali, le malattie autoimmuni o gli alterati stati immunitari.

## **11 ASPETTI LEGALI**

### **11.1 Affidabilità dei risultati**

Il test deve essere eseguito esattamente secondo il protocollo dato dal produttore. Inoltre l'utente deve seguire le regole del GLP (Good Laboratory Practice) o eventualmente altre regole comportamentali o disposizioni legali. Questo vale soprattutto per l'uso delle referenze. È molto importante utilizzare un numero appropriato di referenze in parallelo ai campioni test per poter controllare l'esattezza e la precisione del test.

I risultati del test sono validi soltanto se tutte le referenze cadono nei margini prestabiliti e se tutti gli altri parametri del test soddisfano la specificazione per questo test. Se esistono dubbi o domande su questi risultati, si prega di contattare la ditta DRG.

### **11.2 Conseguenze terapeutiche**

Soltanto sulla base dei risultati dei laboratori non dovrebbero essere intraprese delle conseguenze terapeutiche di alcun tipo, anche se i risultati del test sono d'accordo con gli aspetti articolati nel punto 11.1. Ogni risultato di laboratorio è soltanto una parte di un quadro clinico completo di un paziente.

Soltanto in casi in cui i risultati di un test del laboratorio si accordano con il quadro clinico dell'ammalato, si possono intraprendere delle conseguenze terapeutiche.

Il risultato del test da solo non è base sufficiente per lo stabilimento di una terapia.

### **11.3 Responsabilità legali**












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

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

## 12 REFERENCES / LITERATURE

1. Hasegawa H, Tanaka H and Shibahara H. Infertility and immunocontraception based on zona pellucida. *Reprod Med Biol*, 2014, 13 :1-9.
2. Sacco A, and Moghissi K. Anti-zona pellucida activity in human sera. *Fertility and Sterility*, 1979, 31(5), 503-6.
3. Bronson RA, Cooper GW, and Rosenfeld DL. Sperm-specific isoantibodies and autoantibodies inhibit the binding of human sperm to the human zona pellucida. *Fertility and Sterility*, 1982, 38 (6), 724-9.
4. Mori T et al. A method for specific detection of autoantibodies to the zona pellucida in infertile women. *Fertility and Sterility*, 1979, 32(1), 67-72.
5. Nishimoto T et al. Autoantibodies to zona pellucida in infertile and aged women. *Fertility and Sterility*, 1980, 34(6), 552-5.
6. Mohammadi Yeganeh et al. The association of different auto-antibodies against ovarian tissues and gonadotropins and poor ovarian response in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 2017, 20(2), 126-131.
7. Kamada M et al. Sperm–zona pellucida interaction and immunological infertility. *Reproductive Medicine and Biology*, 2006; 5, 95 –104.
8. Ivanova M. et al. Zona pellucida autoantibodies in women undergoing ART. *Folia Biologica*, 1999, 45(2), 59-62.
9. Koyama K et al. Follicular dysfunction induced by autoimmunity to zona pellucida. *Reproductive Biology*, 2005, 5(3), 269-278.

## SYMBOLS USED

Symbol	English	Deutsch	Italiano	Español	Français
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conformità europea	Conformidad europea	Conformité normes européennes
	Consult instructions for use *	Gebrauchsanweisung beachten *	Consultare le istruzioni per l'uso	Consulte las instrucciones de uso	Consulter les instructions d'utilisation
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device *	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum *	Dispositivo medico-diagnostico in vitro	Producto sanitario para diagnóstico in vitro	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Catalogue number *	Artikelnummer *	No. di Cat.	No de catálogo	Référence
	Batch code *	Chargencode *	Lotto no	Número de lote	No. de lot
	Contains sufficient for <n> tests *	Ausreichend für <n> Prüfungen *	Contenuto sufficiente per "n" saggi	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenu suffisant pour "n" tests
	Temperature limit *	Temperaturbegrenzung *	Temperatura di conservazione	Temperatura de conservación	Température de conservation
	Use-by date *	Verwendbar bis *	Data di scadenza	Fecha de caducidad	Date limite d'utilisation
	Manufacturer *	Hersteller *	Fabbricante	Fabricante	Fabricant
	Caution *	Achtung *			
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Solo a scopo di ricerca	Sólo para uso en investigación	Seulement dans le cadre de recherches
<i>Distributed by</i>	Distributed by	Vertreiber	Distributore	Distribuidor	Distributeur
<i>Content</i>	Content	Inhalt	Contenuto	Contenido	Conditionnement
<i>Volume/No.</i>	Volume / No.	Volumen / Anzahl	Volume / Quantità	Volumen / Número	Volume / Quantité
<i>Microtiterwells</i>	Microtiterwells	Mikrotiterwells	Micropozzetti	Placas multipocillo	Plaques de micro-titration
<i>Antiserum</i>	Antiserum	Antiserum	Antisiero	Antisero	Antisérum
<i>Enzyme Conjugate</i>	Enzyme Conjugate	Enzymkonjugat	Tracciante enzimatico	Conjugado enzimático	Conjugué enzymatique
<i>Enzyme Complex</i>	Enzyme Complex	Enzymkomplex	Complesso enzimatico	Complejo enzimático	Complexe enzymatique
<i>Substrate Solution</i>	Substrate Solution	Substratlösung	Soluzione di substrato	Solución de sustrato	Solution substrat
<i>Stop Solution</i>	Stop Solution	Stopplösung	Soluzione d'arresto	Solución de parada	Solution d'arrêt
<i>Zero Standard</i>	Zero Standard	Nullstandard	Standard zero	Estándar cero	Zero Standard
<i>Standard</i>	Standard	Standard	Standard	Estándar	Standard
<i>Control</i>	Control	Kontrolle	Controllo	Control	Contrôle
<i>Assay Buffer</i>	Assay Buffer	Assaypuffer	Tampone del test	Tampón de ensayo	Tampon d'essai
<i>Wash Solution</i>	Wash Solution	Waschlösung	Soluzione di lavaggio	Solución de lavado	Solution de lavage
<i>1N NaOH</i>	1N NaOH	1N NaOH	1N NaOH (idrossido di sodio 1N)	1N NaOH	1N NaOH
<i>1 N HCl</i>	1 N HCl	1 N HCl		1 N HCl	1N HCl
<i>Sample Diluent</i>	Sample Diluent	Probenverdünnungsmedium	Diluyente dei campioni	Solución para dilución de la muestra	Solution pour dilution de l'échantillon
<i>Conjugate Diluent</i>	Conjugate Diluent	Konjugatverdünnungsmedium	Diluyente del tracciante	Solución para dilución del conjugado	Solution pour dilution du conjugué