



Instructions for Use

FGF23 ELISA



REF EIA-6060

 **96**



DRG 

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
E-mail: drg@drg-diagnostics.de

Distributed by:

DRG 

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

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

Table of Contents / Inhaltsverzeichnis / Tabella dei Contenuti / Tabla de Contenidos / Sommaire

1	INTRODUCTION.....	3
2	CONTENTS OF THE KIT	3
3	ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT.....	3
4	MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	3
5	REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION.....	3
6	PRINCIPLE OF THE ASSAY	4
7	ASSAY PROTOCOL	5
8	CALCULATION OF RESULTS.....	5
9	ASSAY CHARACTERISTICS	6
10	PRECISION	6
11	TECHNICAL HINTS	7
12	PRECAUTIONS	7
1	EINLEITUNG.....	8
2	INHALT DES KITS	8
3	ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT	8
4	ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE.....	8
5	REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG.....	9
6	TESTPRINZIP.....	9
7	TESTPROTOKOLL	10
8	BERECHNUNG DER ERGEBNISSE	10
9	TESTMERKMALE	11
10	PRÄZISION.....	11
11	TECHNISCHE MERKMALE.....	12
12	VORSICHTSMASSNAHMEN.....	12
1	INTRODUZIONE.....	13
2	CONTENUTO DEL KIT	13
3	MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT	13
4	4) MATERIALE RICHIESTO MA NON TORNTTO	13
5	PREPARAZIONE DEL REATTIVI E DEL CAMPIONI	14
6	PRINCIPIO DEL METOD	14
7	PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO	15
8	CALCOLO DEL RISULTATI.....	15
9	CARATTERISTICHE DEL DOSAGGO	16
10	PRECISIONE	16
11	CONSIDERAZIONI TECNICHE	16
12	PRECAUZIONI.....	16

1	INTRODUCCIÓN	17
2	CONTENIDO DEL KIT	17
3	MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT	17
4	MATERIAL Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO.....	17
5	REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	18
6	PRINCIPIO DEL ENSAYO	18
7	PROTOCOLO DEL ENSAYO	19
8	CÁLCULO DE RESULTADOS	19
9	CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO	20
10	PRECISION	20
11	OBSERVACIONES TÉCNICAS	21
12	PRECAUCIONES.....	21
1	INTRODUCTION.....	22
2	CONTENU DE LA TROUSSE	22
3	AUTRE MATÉRIEL INCLUS DANS LA TROUSSE.....	22
4	MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS	22
5	PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET DES ÉCHANTILLONS	22
6	PRINCIPE DU DOSAGE.....	23
7	PROTOCOLE DU DOSAGE	24
8	CALCUL DES RÉSULTATS.....	24
9	CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE	25
10	PRÉCISION	25
11	CONSEILS TECHNIQUES.....	26
12	PRÉCAUTIONS	26
13	LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE	27
SYMBOLS USED		29

**ELISA FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF HUMAN FGF23 (C-TERMINAL)
IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA, AND CITRATE PLASMA**

1 INTRODUCTION

FGF23 (fibroblast growth factor 23) is a 32 kDa protein with 251 amino acids that is proteolytically processed between arginine¹⁷⁹ and serine¹⁸⁰ to generate N-terminal and C-terminal fragments. FGF23 is mainly secreted by osteocytes and controls phosphate and 1,25(OH)₂ vitamin D homeostasis.

2 CONTENTS OF THE KIT

CONTENTS	KIT COMPONENTS	QUANTITY
PLATE	Anti FGF23 pre-coated microtiter strips in a strip holder, packed in an aluminium bag with desiccant	12 x 8 tests
WASHBUF	Wash buffer concentrate 20x, natural cap	1 x 50 mL
ASYBUF	Assay buffer, red cap, ready to use	1 x 20 mL
AB	Rabbit polyclonal anti FGF23 antibody, biotin labelled, green cap, green dye, ready to use	1 x 6 mL
STD	Standards 1-7 (0; 0.2; 0.6; 1.8; 5; 10; 20 pmol/L), recombinant human FGF23 in human serum, white caps, lyophilized	7 vials
CTRL	Controls A + B, yellow caps, lyophilized (exact concentrations after reconstitution see labels)	2 vials
CONJ	Conjugate, (streptavidin-HRPO), amber bottle, amber cap, ready to use	1 x 13 mL
SUB	Substrate (TMB solution), amber bottle, blue cap, ready to use	1 x 13 mL
STOP	Stop solution, white cap, ready to use	1 x 7 mL

3 ADDITIONAL MATERIAL IN THE KIT

- 2 self-adhesive plastic films
- Quality control protocol
- Protocol sheet
- Instruction for use

4 MATERIAL AND EQUIPMENT REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- Precision pipettes calibrated to deliver 10 µL, 50 µL, 100 µL, 300 µL, 400 µL, and disposable tips
- Distilled or deionised water
- Plate washer is recommended for washing, alternative multichannel pipette or manifold dispenser
- Refrigerator with 4 °C (2 °C - 8 °C)
- ELISA reader capable of measuring absorbance at 450 nm (with correction wavelength at 630 nm)
- Graph paper or software for calculation of results

5 REAGENTS AND SAMPLE PREPARATION

All reagents as supplied in the kit are stable at 4 °C (2 °C - 8 °C) until expiry date stated on the label of each reagent.

5.1 Sample preparation/dilution

Collect venous blood samples by using standardized blood collection tubes for serum or plasma. We recommend performing plasma or serum separation by centrifugation immediately, e.g. 20 min at 2000 × g at 4 °C (2 °C - 8 °C). The acquired serum or plasma samples should be measured as soon as possible. For longer storage aliquot and store at -25 °C or lower. Samples are stable for 4 freeze-thaw cycles. Lipemic or haemolysed samples may give erroneous results. Samples should be mixed well before assaying. We recommend duplicates for all values.

**If samples read higher than STD7, we recommend to dilute
serum samples 1:11 (1+10, e.g. 10 µL sample + 100 µL ASYBUF) and
plasma samples 1:41 (1+40, e.g. 10 µL + 400 µL ASYBUF) and to test again.**

The kit incorporates sufficient assay buffer (ASYBUF) for a 1:41 dilution of 40 samples. Additional ASYBUF can be ordered free of charge on request.

For further information on sample stability please contact our customer service by e-mail drg@drg-diagnostics.de

5.2 Reconstitution/Handling

WASHBUF (Wash buffer):

Dilute the concentrate 1:20, e.g. 50 mL WASHBUF + 950 mL distilled water.

Crystals in the buffer concentrate will dissolve at room temperature.

The undiluted WASHBUF is stable at 4 °C (2 °C - 8 °C) until expiry date stated on label.

The diluted WASHBUF is stable up to one month at 4 °C (2 °C - 8 °C). Only use diluted WASHBUF when performing the assay.

STD (Standards) + CTRL (Controls):

Pipette 400 µL of distilled or deionised water into each vial.

Leave at room temperature (18 °C - 24 °C) for 15 min. Vortex gently.

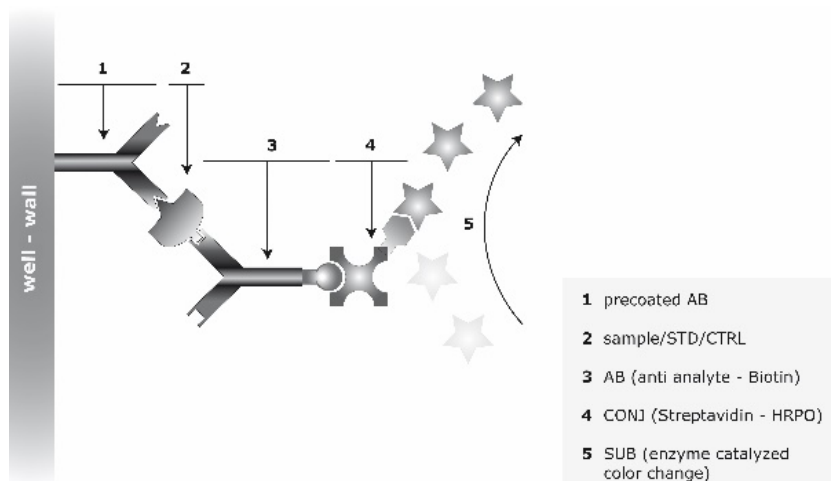
The exact concentration is printed on the label.

Reconstituted STDs and CTRLs are stable for 4 h at room temperature (18 °C - 24 °C) or at -25 °C or lower until expiry date stated on the label.

STDs and CTRLs are stable for 3 freeze-thaw cycles.

6 PRINCIPLE OF THE ASSAY

This kit is a sandwich enzyme immunoassay for the direct determination of FGF23 in human serum and plasma samples. In a first step, STD/sample/CTRL and detection antibody (rabbit polyclonal anti human FGF23-Biotin) are pipetted into the wells of the microtiter strips, which are pre-coated with anti FGF23 antibody. FGF23 present in the STD/sample/CTRL binds to the pre-coated antibody in the well and forms a sandwich with the detection antibody. In the washing step all non-specific unbound material is removed. In a second step, the conjugate (Streptavidin-HRPO) is pipetted into the wells and reacts with the detection antibody. After another washing step, the substrate (TMB Tetramethylbenzidine) is pipetted into the wells. The enzyme catalysed colour change of the substrate is directly proportional to the amount of FGF23. This colour change is detectable with a standard microtiter plate ELISA reader. A dose response curve of the absorbance (optical density, OD at 450 nm) vs. standard concentration is generated, using the values obtained from the standard. The concentration of FGF23 in the sample is determined directly from the dose response curve.



7 ASSAY PROTOCOL

All reagents and samples must be at room temperature (18 °C - 24 °C) before use in the assay.

Mark position for STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) on the protocol sheet.

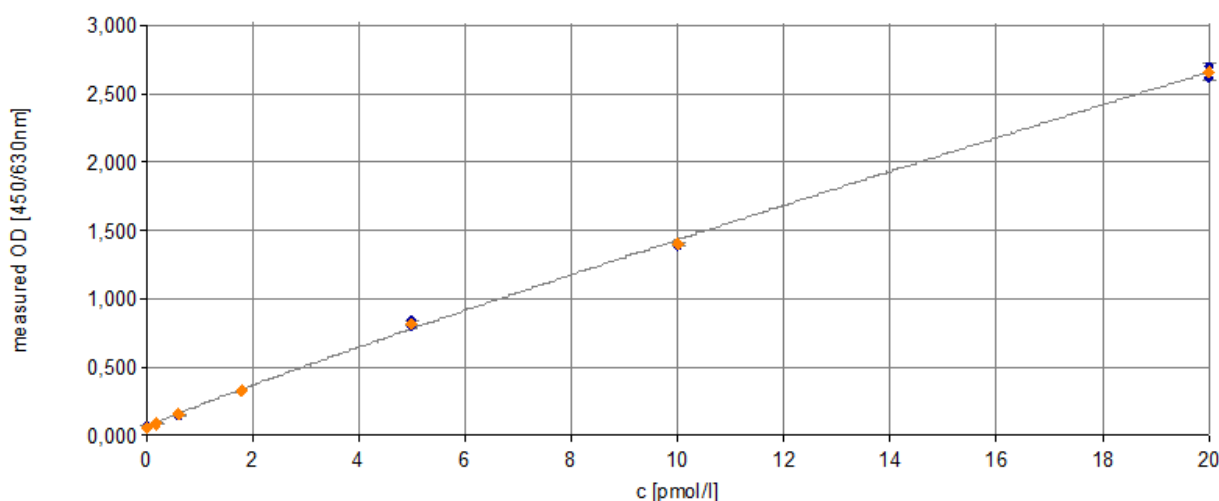
Take microtiter strips out of the aluminium bag. Store unused strips with desiccant at 4 °C (2 °C - 8 °C) in the aluminium bag. Strips are stable until expiry date stated on the label.

1. Pipette 50 µL STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Sample/Control) in duplicate into respective well.
2. Add 50 µL AB (biotinylated anti FGF23 antibody, green cap, green dye) into each well, mix gently.
3. **Cover tightly and incubate overnight (20 - 24 h) at room temperature (18 °C - 24 °C).**
4. Aspirate and wash wells 5x with 300 µL diluted WASHBUF (Wash buffer, natural cap). Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
5. Add 100 µL CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.
6. **Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18 °C - 24 °C) in the dark.**
7. Aspirate and wash wells 5x with 300 µL diluted WASHBUF (Wash buffer, natural cap). Remove remaining WASHBUF by strongly tapping plate against paper towel after the last wash.
8. Add 100 µL SUB (Substrate, blue cap) into each well.
9. **Incubate for 30 minutes at room temperature (18 °C - 24 °C) in the dark.**
10. Add 50 µL STOP (Stop solution, white cap) into each well, mix gently.
11. Measure absorbance immediately at 450 nm with reference 630 nm, if available.

8 CALCULATION OF RESULTS

Read the optical density (OD) of all wells on a plate reader using 450 nm wavelength (correction wavelength 630 nm). Construct the standard curve from the OD values of the STD. Use commercially available software or graph paper. Obtain sample concentration from this standard curve. The assay was evaluated with logit-log and 4PL algorithm curve fitting. Different curve fitting methods need to be evaluated by the user. Respective dilution factors have to be considered when calculating the final concentration of the sample.

Example typical STD-curve:



The quality control (QC) protocol supplied with the kit shows the results of the final release QC for each kit lot. Data for OD obtained by customers may differ due to various influences and/or due to the normal decrease of signal intensity during shelf life. However, this does not affect validity of results as long as an OD of 1.50 or more is obtained for the STD with the highest concentration and the values of the CTRLs are in range (target ranges see labels).

9 ASSAY CHARACTERISTICS

Method:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-well strips			
Sample type:	Serum, EDTA plasma, heparin plasma, and citrate plasma			
Standard range:	0 to 20 pmol/L (7 standards and 2 controls in a human serum matrix)			
Conversion factor:	FGF23, C-terminal: 1 pg/mL = 0.133 pmol/L (MW: 7.52 kDa)			
Sample volume:	50 µL / well			
Incubation time:	20 h - 24 h / 1 h / 30 min			
Sensitivity:	LOD: (0 pmol/L + 3 SD): 0.08 pmol/L; LLOQ: 0.1 pmol/L			
Specificity:	This assay recognizes endogenous and recombinant human FGF23. The assay measures both intact and C-terminal fragments of FGF23.			
Precision:	Intra-assay (n=6) ≤ 12% , Inter-assay (n=10) ≤ 10%			
Spike/Recovery (average recovery spiked with 5 pmol/L rec. FGF23):	Serum (n=13): 96%	Heparin plasma (n=8): 101%		
	EDTA plasma (n=7): 97%	Citrate plasma (n=7): 100%		
Dilution linearity (average recovery of expected FGF23 after a 1+1; 1+3; 1+7 dilution):	Dilution:	1+1	1+3	1+7
	Serum (n=9)	105%	100%	108%
	EDTA plasma (n=4)	103%	103%	106%
	Heparin plasma (n=10)	107%	106%	104%
	Citrate plasma (n=5)	102%	106%	101%
Values from apparently healthy individuals:	Median serum (n=35): 0.8 pmol/L Median EDTA plasma (n=22): 1.3 pmol/L Median heparin plasma (n=22): 1.2 pmol/L Median citrate plasma (n=30): 1.4 pmol/L Each laboratory should establish its own reference range for the samples under investigation. Do not change sample type during the study.			

For further information on assay characteristics please contact our customer service by e-mail drg@drg-diagnostics.de

10 PRECISION

Intra-assay: 2 samples of known concentration were tested 6 times within 1 kit lot by 1 operator.

Inter-assay: 2 samples of known concentration were tested 10 times within 2 different kit lots by 4 different operators.

Intra-assay (n=6)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/L)	0.6	10.0
SD (pmol/L)	0.07	0.6
CV (%)	12	6

Inter-assay (n=10)	Sample 1	Sample 2
Mean (pmol/L)	0.6	9.9
SD (pmol/L)	0.06	0.5
CV (%)	10	5

Detailed information on the FGF23 (C-terminal) ELISA, e.g. assay performance characteristics, matrix comparisons, and stability data is available upon request.

11 TECHNICAL HINTS

- Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.
- Do not mix stoppers and caps from different reagents or use reagents between lots.
- Do not use reagents beyond expiration date.
- Protect reagents from direct sunlight.
- Substrate solution should remain colourless until added to the plate.
- To ensure accurate results, proper adhesion of plate sealers during incubation steps is necessary.
- Avoid foaming when mixing reagents.

12 PRECAUTIONS

All test components of human source were tested against HIV-Ab and HBsAg and were found negative.

Nevertheless, they should be handled and disposed as if they were infectious.

All liquid reagents contain $\leq 0.1\%$ Proclin 300 as preservative. Avoid contact with skin and mucous membrane.

Proclin 300 is not toxic in concentrations used in this kit. It may cause allergic skin reactions – avoid contact with skin or eyes.

- Do not pipette by mouth.
- Do not eat, drink, smoke, or apply cosmetics where reagents are used.
- Wear gloves, glasses, and lab coat while performing this assay.
- Sulfuric acid is irritating to the eyes and skin. Avoid contact with skin and mucous. Irritations are possible. Flush with water if contact occurs!

**ELISA ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON HUMANEM FGF23 (C-TERMINAL)
IN SERUM, EDTA PLASMA, HEPARIN PLASMA UND CITRAT PLASMA**

1 EINLEITUNG

FGF23 (Fibroblast growth factor 23) ist ein 32 kDa Protein mit 251 Aminosäuren. Es wird proteolytisch zwischen Arginin¹⁷⁹ und Serin¹⁸⁰ in die N-terminalen und C-terminalen Fragmente gespalten. FGF23 wird hauptsächlich von Osteozyten produziert und kontrolliert die Homöostase von Phosphat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

2 INHALT DES KITS

CONTENTS	KIT KOMPONENTEN	MENGE
PLATE	Anti FGF23 Antikörper beschichtet auf Mikrotiterplattenstreifen im Streifenhalter. Verpackt im Aluminium Beutel mit Trockenmittel.	12 x 8 Tests
WASHBUF	Waschpuffer, 20-fach Konzentrat, durchsichtiger Schraubverschluss	1 x 50 mL
ASYBUF	Assay Puffer, roter Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 20 mL
AB	Polyklonaler Kaninchen-Anti-FGF23-Antikörper, biotinyliert, grün gefärbt, grüner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 6 mL
STD	Standards 1-7 (0; 0,2; 0,6; 1,8; 5; 10; 20 pmol/L), rekombinantes humanes FGF23 in humanem Serum, weißer Schraubverschluss, lyophilisiert	7 Fläschchen
CTRL	Kontrollen A + B, gelber Schraubverschluss, lyophilisiert (genaue Konzentrationen siehe Etiketten)	2 Fläschchen
CONJ	Konjugat (Streptavidin-HRPO), braune Flasche, brauner Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 mL
SUB	Substrat (TMB Lösung), braune Flasche, blauer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 13 mL
STOP	Stopp Lösung, weißer Schraubverschluss, gebrauchsfertig	1 x 7 mL

3 ZUSÄTZLICHES MATERIAL IM KIT

- Selbstklebende Abdeckfolien
- QC-Protokoll
- Protokoll-Blatt
- Gebrauchsanweisung (Beipacktext)

4 ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL UND GERÄTE

- Kalibrierte Präzisionspipetten für 10 µL, 50 µL, 100 µL, 300 µL, 400 µL, inkl. Pipettenspitzen
- Destilliertes oder deionisiertes Wasser
- Mikrotiterplatten-Waschgerät wird empfohlen, Alternativen: Mehrkanalpipetten oder Dispenser
- Kühlschrank mit 4 °C (2 °C - 8 °C)
- Mikrotiterplattenphotometer mit 450 nm Filter (630 nm Referenz)
- Millimeterpapier oder Software

5 REAGENZIEN UND PROBENVORBEREITUNG

Alle Reagenzien des Kits sind vor Verwendung bei 4 °C (2 °C - 8 °C) bis zum Ablaufdatum (siehe Etikett des Reagenz) haltbar.

5.1 Probenvorbereitung/-verdünnung

Abnahme von venösem Blut mittels standardisierter Blutabnahmeröhrchen zur Gewinnung von Serum oder Plasma. Wir empfehlen die Zentrifugation des Blutes für 20 Minuten bei 2000 g, bevorzugt bei 4 °C (2 °C - 8 °C), so schnell wie möglich. Das gewonnene Serum oder Plasma soll so schnell wie möglich gemessen werden. Für Langzeitlagerung sollen die Proben aliquotiert und bei -25 °C oder tiefer gelagert werden. Bis zu 4 Frier-/Tau-Zyklen verändern die Messwerte nicht. Lipämische und hämolytische Proben können falsche Ergebnisse liefern. Proben vor Verwendung gut mischen. Wir empfehlen Doppelbestimmung für alle Werte.

Proben mit Ergebnissen über STD7 können mit ASYBUF (Assay Puffer) wie folgt verdünnt und erneut getestet werden:

Serumproben: 1:11 (1+10, z.B. 10 µL Serum + 100 µL ASYBUF)

Plasmaproben: 1:41 (1+40, z.B. 10 µL Plasma + 400 µL ASYBUF)

Im Kit ist ausreichend Assay Puffer (ASYBUF) für eine 1:41 Verdünnung von 40 Proben. Zusätzlicher ASYBUF ist auf Anfrage gratis erhältlich.

Für nähere Informationen zur Probenstabilität kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an drg@dr-g-diagnostics.de.

5.2 Rekonstitution/Handhabung

WASHBUF (Waschpuffer):

Das mitgelieferte Konzentrat wird 1:20 verdünnt (z.B. 50 mL WASHBUF + 950 mL destilliertes Wasser). Kristalle im Pufferkonzentrat lösen sich bei Raumtemperatur auf.

Das Konzentrat ist bei 4 °C (2 °C - 8 °C) bis zum Ablaufdatum haltbar.

Der verdünnte Puffer ist bei 4 °C (2 °C - 8 °C) bis zu einem Monat haltbar.

Im Testsystem darf nur verdünnter WASHBUF (Waschpuffer) verwendet werden.

STD (Standards) und CTRL (Kontrollen):

Lösen Sie das Lyophilisat in jeweils 400 µL destilliertem oder deionisiertem Wasser bei Raumtemperatur (18 °C - 24 °C) für 15 min. Gut mischen.

Die genaue Konzentration ist am Etikett vermerkt.

Rekonstituierte STD und CTRL sind bei -25 °C oder tiefer bis zum Ablaufdatum haltbar.

STD und CTRL sind für 3 Frier/Tau-Zyklen stabil.

6 TESTPRINZIP

Der Test basiert auf der Methode eines Sandwich ELISA und dient zur quantitativen Bestimmung von FGF23 in humanen Serum und Plasmaproben.

Zuerst werden STD/Probe/CTRL und Detektionsantikörper (polyklonaler Hase-anti-human-FGF23-Biotin) in die entsprechenden Vertiefungen, welche mit anti-human-FGF23-Antikörper beschichtet sind, pipettiert. Das in den STD/Proben/CTRL vorhandene FGF23 bildet mit beiden Antikörper einen stabilen Komplex. Durch Waschen werden die unspezifischen und nicht gebundenen Anteile entfernt. Nach Zugabe von Konjugat (Streptavidin-HRPO), das mit dem Detektionsantikörper reagiert, und einem weiteren Waschschriff, wird mit Substrat (TMB Tetramethylbenzidine) inkubiert. Die dadurch enzymatisch bedingte Farbentwicklung ist direkt proportional mit der FGF23 Konzentration in den Proben und kann mittels eines Mikrotiterplatten ELISA Reader gemessen werden. Aus dem jeweiligen Farbsignal und den Konzentrationen der STD wird eine Kalibrationskurve erstellt, von der die FGF23 Konzentration der Proben direkt ablesbar ist.

Schema siehe Kapitel 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* im englischen Teil des Beipacktextes.

7 TESTPROTOKOLL

Im Test dürfen nur Reagenzien und Proben verwendet werden, welche Raumtemperatur (18 °C - 24 °C) aufweisen.

Markieren Sie die Positionen für STD/PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) am Protokoll Blatt.

Nehmen Sie die benötigten Mikrotiterstreifen aus dem Aluminium Beutel. Nicht verwendete Mikrotiterstreifen können mit Trockenmittel im Aluminium Beutel auf 4 °C (2 °C - 8 °C) bis zum angegebenen Ablaufdatum gelagert werden.

1. Pipettieren Sie 50 µL STD /PROBE/CTRL (Standard/Probe/Kontrolle) in Doppelbestimmung in die Mikrotiterstreifen.
2. Pipettieren Sie 50 µL AB (biotinylierter anti-FGF23-Antikörper, grüner Schraubverschluss, grün gefärbt) in die Mikrotiterstreifen, gut mischen.
3. **Streifen abdecken und bei Raumtemperatur (18 °C - 24 °C) über Nacht (20 - 24 h) inkubieren.**
4. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µL verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen.
Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
5. Pipettieren Sie 100 µL CONJ (Konjugat, brauner Schraubverschluss) in alle Wells.
6. **Streifen abdecken und bei Raumtemperatur (18 °C - 24 °C) für 1 Stunde im Dunkeln inkubieren.**
7. Inhalt der Wells verwerfen und 5x mit 300 µL verdünntem WASHBUF (Waschpuffer) waschen.
Nach dem letzten Waschschrift Reste von Waschpuffer durch Ausklopfen auf saugfähigem Papier entfernen.
8. Pipettieren Sie 100 µL SUB (Substrat, blauer Schraubverschluss) in alle Wells.
9. **Bei Raumtemperatur (18 °C - 24 °C) für 30 Minuten im Dunkeln inkubieren.**
10. Pipettieren Sie 50 µL STOP (Stopplösung, weißer Schraubverschluss) in alle Wells, gut mischen.
11. Extinktion unmittelbar bei 450 nm messen, mit 630 nm als Referenz, falls möglich.

8 BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Messen Sie die optische Dichte (OD) von allen Wells mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit einem 450 nm-Filter (Referenz 630 nm). Konstruieren Sie eine Standardkurve aus den OD Werten der STD unter Verwendung von kommerziell erhältlichem Millimeterpapier oder einer geeigneten Software. Das Testsystem wurde mittels Logit-Log sowie einem 4 Parameter Algorithmus evaluiert. Andere Auswerte Algorithmen müssen vom Verwender evaluiert werden. Die Konzentration der Proben wird aus der Standardkurve abgelesen. Eventuelle Verdünnungen müssen berücksichtigt werden.

Typische STD-Kurve:

Siehe Kapitel 8) *CALCULATION OF RESULTS* im englischen Teil des Beipacktextes.

In dem beigegepackten QC Protokoll sind die Resultate der QC-Freigabe der entsprechenden Kit- Lot vermerkt. Vom Verwender erhaltene Daten der OD können abweichend sein, bedingt durch verschiedene Einflüsse und/oder dem normalen Signalverlust des Kits während der Laufzeit. Dieser mögliche Signalverlust hat keinen Einfluss auf die Gültigkeit der Resultate, so lange die OD von STD7 den Wert 1,50 oder höher erreicht und die Werte der CTRL im gültigen Bereich sind (Bereiche siehe Etiketten).

9 TESTMERKMALE

Methode:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12 x 8-well strips			
Probentyp:	Serum, EDTA Plasma, Heparin Plasma und Citrat Plasma			
Standardbereich:	0 bis 20 pmol/L (7 Standards und 2 Kontrollen in humaner Serum-Matrix)			
Umrechnungsfaktor pg/mL zu pmol/L:	1 pg/mL = 0,133 pmol/L (MW: 7,52 kD)			
Probenvolumen:	50 µL / Vertiefung			
Inkubationszeiten:	20 h - 24 h / 1 h / 30 min			
Sensitivität:	LOD: (0 pmol/L + 3 SD): 0,08 pmol/L; LLOQ: 0,1 pmol/L			
Spezifität	Dieser Assay erkennt endogenes und rekombinantes humanes FGF23. Der Assay misst intakte und C-terminale Fragmente von FGF23.			
Präzision:	Intra-Assay (n=6) ≤ 12%, Inter-Assay (n=10) ≤ 10%			
Wiederfindung (durchschnittliche Wiederfindung nach Spike mit 5 pmol/L rek. FGF23):	Serum (n=13) = 96%		Heparinplasma (n=8) = 101%	
	EDTA-plasma (n=7) = 97%		Zitratplasma (n=7) = 100%	
Verdünnungslinearität (durchschnittliche FGF23 Werte nach VD mit ASYBUF):	Verdünnung:	1+1	1+4	1+7
	Serum (n=15)	105%	100%	108%
	EDTA plasma (n=7)	103%	103%	106%
	Heparin plasma (n=15)	107%	106%	104%
	Citrat plasma (n=5)	102%	106%	101%
Werte von anscheinend gesunden Spendern:	Median Serum (n = 35) = 0,8 pmol/L Median EDTA-Plasma (n=22) = 1,3 pmol/L Median Heparinplasma (n=22) = 1,2 pmol/L Median Zitratplasma (n=30) = 1,4 pmol/L Jedes Labor sollte den Normalbereich für seine Proben evaluieren. Wechseln Sie nicht die Probenmatrix innerhalb einer Studie.			

Für nähere Informationen zu den Testmerkmalen kontaktieren Sie unseren Kundenservice per Email an drg@dr-g-diagnostics.de.

10 PRÄZISION

Intra-Assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 6mal in 1 Test von 1 Operator getestet.

Inter-Assay: 2 Proben bekannter Konzentration wurden 10mal in 2 Kit Lots von 4 verschiedenen Operatoren getestet.

Intra-Assay (n=6)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/L)	0,6	10,0
SD (pmol/L)	0,07	0,6
VK (%)	12	6

Inter-Assay (n=10)	Probe 1	Probe 2
Durchschnitt (pmol/L)	0,6	9,9
SD (pmol/L)	0,06	0,5
VK (%)	10	5

Detaillierte Informationen zum FGF23 (C-terminal) ELISA, z.B. Testmarkmale, Matrix Vergleiche und Stabilitätsdaten, sind auf Anfrage erhältlich.

11 TECHNISCHE MERKMALE

- Reagenzien von verschiedenen Lots oder Tests dürfen nicht gemischt werden.
- Stöpsel und Verschlüsse von verschiedenen Reagenzien dürfen nicht vertauscht werden.
- Abgelaufene Reagenzien dürfen nicht verwendet werden.
- Reagenzien sind vor direktem Sonnenlicht zu schützen.
- Substratlösung muss vor Verwendung farblos sein.
- Mikrotiterstreifen müssen bei den Inkubationen mit Abdeckfolie abgedeckt sein.
- Vermeiden Sie Schaumbildung beim Mischen der Reagenzien.

12 VORSICHTSMASSNAHMEN

Alle Bestandteile humanen Ursprunges wurden auf HIV-Ak und HBsAg getestet und negativ gefunden. Trotzdem sollten die Reagenzien als potentiell infektiös behandelt werden.

Alle flüssigen Reagenzien enthalten 0,01% Proclin 300 als Konservierungsmittel. Vermeiden Sie Kontakt mit Augen, Haut und Schleimhaut. Proclin 300 ist in der verwendeten Konzentration nicht toxisch. Allergische Reaktionen sind möglich.

- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Nicht Rauchen, Essen, Trinken oder Kosmetika benutzen während der Verwendung der Testreagenzien.
- Verwenden Sie Handschuhe, Schutzbrillen und Laborkleidung während der Testdurchführung.
- Schwefelsäure reizt Augen und Haut. Bei Berührung gründlich mit Wasser spülen.

**ELISA PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI FGF23 (C-TERMINAL) UMONA
SU CAMPIONI DI SIERO, PLASMA-EDTA, PLASMA EPARINA E PLASMA CITRATO**

1 INTRODUZIONE

FGF23 (fattore di crescita dei fibroblasti 23) è una proteina da 32 kDa con 251 aminoacidi che viene clivata tra l'arginina in posizione 179 e la serina in posizione 180 per generare i frammenti N-terminale e C-terminale. FGF23 è secreta principalmente da osteociti, e controlla l'omeostasi del fosfato e della 1,25 (OH) 2 vitamina D.

2 CONTENUTO DEL KIT

CONT	COMPONENTI DEL KIT	QUANTITÀ
PLATE	Strisce di microtitolazione pre-sensibilizzate con anti FGF23 policlonale e cornice per le strip, confezionate in busta con dessiccante	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampone per il lavaggio, concentrato 20x, tappo trasparente	1 x 50 mL
ASYBUF	Tampone di dosaggio, pronto all'uso, tappo rosso	1 x 20 mL
AB	Anticorpi policlonali di lepore anti FGF23, biotina marcata, tappo verde, colorante verde, pronto per l'uso	1 x 6 mL
STD	Standard 1-7 (0; 0.2; 0.6; 1.8; 5; 10; 20 pmol/L), FGF23 ricombinate umano en siero umano, tappo bianco, liofilizzati	7 flaconi
CTRL	Controllo A + B, tappo giallo, liofilizzato, vedere l'etichetta per l'esatta concentrazione dopo ricostituzione	2 flaconi
CONJ	Coniugato (streptavidin-HRPO), flacone marrone, tappo marrone, pronto all'uso	1 x 13 mL
SUB	Substrato (soluzione di TMB), flacone marrone, tappo blu pronto all'uso	1 x 13 mL
STOP	Soluzione di arresto, acido solforico, tappo bianco, pronta all'uso	1 x 7 mL

3 MATERIALE AGGIUNTIVO CONTENUTO NEL KIT

- 2 copripiastra (pellicola di plastica) auto-adesive
- Protocollo QC
- Templato
- Manuale d'istruzioni d'uso

4 4) MATERIALE RICHIESTO MA NON TORNTO

- Micropipette di precisione calibrate per volumi di 10-50-100-300-400 µL e puntali monouso
- Acqua distillata o deionizzata
- Lavatore di micropiastre (consigliato) o, in alternativa, pipetta multicanale o dispensatore
- Frigorifero a 4°C (2 °C - 8 °C)
- Lettore di micropiastre ELISA con filtri da 450 nm (riferimento da 630 nm)
- Carta millimetrata o software dedicato per il calcolo dei risultati

5 PREPARAZIONE DEL REATTIVI E DEL CAMPIONI

Tutti i reagenti così come forniti nel kit sono stabili a 4 °C (2 °C - 8 °C) fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ogni reagente.

5.1 Preparazione dei campioni

Prelevare i campioni di sangue venoso utilizzando provette standard per siero o plasma.

Si consiglia di separare il siero o il plasma dalla parte corpuscolata centrifugando prima possibile i campioni, es. 20 min a $2000 \times g$, preferibilmente a 4 °C (2 °C - 8 °C). Se ciò non fosse possibile, conservare i campioni a 4 °C (2 °C - 8 °C) prima della centrifugazione (fino ad un giorno). Per una stabilità prolungata nel tempo, conservare i campioni, suddivisi in aliquote, a -25 °C o temperature inferiori. E' possibile congelare-scongelerare i campioni fino ad un massimo di 4 volte. Campioni lipemici o emolizzati possono dare risultati non corretti. Prima del dosaggio agitare su vortex i campioni scongelati. Consigliamo duplicati per tutti i valori.

Si consiglia di diluire i campioni

di siero 1:11 (1 + 10, ad esempio, Campioni 10 µL siero + 100 µL ASYBUF) e

di plasma 1:41 (1 + 40, ad esempio, 10 µL + 400 µL ASYBUF) e testare nuovamente.

Per ulteriori informazioni sulla stabilità dei campioni si prega di contattare: drg@drg-diagnostics.de.

5.2 Modalità di ricostituzione dei reattivi

WASHBUF (Tampone di lavaggio):

Diluire il tampone concentrato 1:20 ad es. 50 mL WASHBUF + 950 mL acqua distillata. I cristalli eventualmente presenti nel tampone concentrato, si disciolgono a temperatura ambiente.

Il tampone non diluito è stabile fino a 4 °C (2 °C - 8 °C) fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta.

Il tampone diluito è stabile fino a un mese a 4 °C (2 °C - 8 °C).

Utilizzare solo il WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito durante l'esecuzione del dosaggio.

STD (Standard) e CTRL (Controllo):

Pipettare 400 µL di acqua deionizzata o distillata in ciascun flacone. La concentrazione esatta è indicata sull'etichetta. Lasciare a riposo per 15 min a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C). Agitare delicatamente.

Ricostituiti standard e controlli sono stabili fino a 4 ore a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) oppure a -25 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta di ciascun flacone;

STD e CTRL sono stabili fino a 3 cicli di congelamento-scongeleramento.

6 PRINCIPIO DEL METOD

Questo kit è in un immunodosaggio enzimatico tipo sandwich per la determinazione diretta della FGF23 in campioni di siero e plasma umano. In una prima fase, STD/campione/CTRL, e detection antibody (anticorpo policlonale di lepre anti FGF23-Biotina umana di topo) vengono pipettati nei pozzetti delle strisce di microtitolazione, sensibilizzati con anticorpo anti FGF23. La FGF23 presente in STD/campione/CTRL si lega all'anticorpo sensibilizzato nei pozzetti formando un "panino" con il detection antibody. Mediante lavaggio viene rimosso tutto il materiale aspecifico non legato. In una seconda fase, il coniugato (Streptavidina-HRPO) viene dispensato nei pozzetti e reagisce con il detection antibody. Dopo un altro lavaggio, viene dispensato il substrato (TMB Tetrametilbenzidina) nei pozzetti. L'enzima catalizzato dal viraggio di colore del substrato è direttamente proporzionale alla quantità di FGF23. Questa variazione di colore è determinabile con l'utilizzo di un normale lettore di micropiastre ELISA. Viene costruita una curva dose-risposta assorbanza (densità ottica, OD a 450 nm) vs concentrazione degli standard, usando i valori ottenuti per gli standard. La concentrazione di FGF23 in un campione viene calcolata direttamente da tale curva dose-risposta.

Vedi capitolo 6) *PRINCIPLE OF THE ASSAY* delle istruzioni in lingua inglese.

7 PROTOCOLLO DEL DOSAGGIO

Portare tutti i reattivi a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) prima dell'uso.

Segnare sul template la posizione per STD/SAMPLE/CTRL (Standard/Campioni/Controllo).

Togliere le strisce della micropiastra dalla confezione. Conservare le strip inutilizzate con il dessiccante a 4 °C (2 °C - 8 °C) nella confezione e sono stabili fino alla data di scadenza.

1. Aggiungere 50 µL di STD/CAMPIONE/CTRL (Standard/Campione/Controllo) in doppio nei corrispondenti pozzetti.
2. Aggiungere 50 µL di AB (bionylated anti-FGF23 antibody) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
3. **Coprire bene con il copripiastra adesivo e incubare per tutta la notte (20-24 h) a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C).**
4. Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µL di WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito, togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
5. Aggiungere 100 µL di CONJ (Coniugato) in tutti i pozzetti.
6. **Incubare per 1 ora a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) al buio.**
7. Aspirare e lavare i pozzetti 5x con 300 µL di WASHBUF (Tampone di lavaggio) diluito, togliere il WASHBUF restante picchiando la micropiastra su carta assorbente dopo l'ultimo lavaggio.
8. Aggiungere 100 µL di SUB (Substrato) in tutti i pozzetti.
9. **Incubare 30 min a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) al buio.**
10. Aggiungere 50 µL di STOP (Soluzione di stop) in tutti i pozzetti, agitare delicatamente.
11. Misurare immediatamente l'assorbanza a 450 nm con filtro di riferimento a 630 nm.

8 CALCOLO DEL RISULTATI

Leggere la densità ottica (OD) di tutti i pozzetti con un lettore di micropiastre utilizzando la lunghezza d'onda 450 nm (correzione con lunghezza d'onda 630 nm). Costruire la curva standard dai valori OD degli standard. Per l'elaborazione dei dati, utilizzare un programma computerizzato o carta millimetrata. Calcolare la concentrazione dei campioni da questa curva standard. Il test è stato valutato con l'interpolazione a 4 parametri. Sistemi di interpolazione differenti devono essere convalidati dagli utilizzatori. Tenere conto dei fattori di diluizione.

Esempio curva tipica:

Vedi capitolo 8) *CALCULATION OF RESULTS* in lingua inglese.

Il protocollo di controllo di qualità (QC) in dotazione con il kit mostra i risultati del controllo di qualità versione finale per ciascun lotto. I dati per OD ottenuti possono variare a causa di vari fattori e / o per la normale diminuzione dell'intensità del segnale durante la lettura. Tuttavia, ciò non influisce validità dei risultati finché un OD di 1,50 o superiore viene ottenuto per il STD con la più alta concentrazione e valori delle CTRL sono nel range.

9 CARATTERISTICHE DEL DOSAGGIO

Metodo:	ELISA tipo Sandwich, HRP/TMB, 12 x 8 strisce di pozzetti			
Tipo di campione:	Siero, plasma-EDTA, plasma-Eparina e plasma-Citrato			
Intervallo degli standard:	Da 0 a 20 pmol/L (7 standard ed 2 controllo su matrice di siero umano)			
Fattore di conversione:	FGF23, C-Terminal: 1pg/mL = 0.133 pmol/L (MW: 7.52 kDa)			
Volume di campione:	50 µL / pozzetto			
Tempo di incubazione:	20 h - 24 h / 1 h / 30 min			
Sensibilità:	LOD: (0 pmol/L + 3 SD): 0,08 pmol/L; LLOQ: 0,1 pmol/L			
Specificità:	Questo test riconosce FGF23 umano ricombinante. Il test misura entrambi i frammenti intatti e C-terminale di FGF23.			
Precisione:	Intra-saggio (n=6) ≤ 12%, Inter-saggio (n=10) ≤ 10%			
Recupero (media del recupero dopo aggiunta di FGF23 ricombinante):	Siero (n=13): 96%		Plasma-Eparina (n=8): 101%	
	Plasma-EDTA (n=7): 97%		Plasma-Citrato (n=7): 100%	
Linearità della diluizione (media del recupero della FGF23 attesa dopo diluizione 1+1; 1+3; 1+7):	Diluizione:	1+1	1+3	1+7
	Siero (n=9)	105%	100%	108%
	Plasma-EDTA (n=4)	103%	103%	106%
	Plasma-Eparina (n=10)	107%	106%	104%
	Plasma-Citrato (n=5)	102%	106%	101%
Valori attesi per gli individui apparentemente sani:	Mediana su siero (n=35): 0,8 pmol/L Mediana su plasma-EDTA (n=22): 1,3 pmol/L Mediana su plasma-Eparina (n=22): 1,2 pmol/L Mediana su plasma-Citrato (n=30): 1,4 pmol/L Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire dei propri intervalli di riferimento a seconda dei campioni esaminati. Non cambiare tipo di campione durante lo studio dei valori attesi.			

Per ulteriori informazioni sulla caratteristiche del dosaggio si prega di contattare: drg@drg-diagnostics.de.

10 PRECISIONE

Intra-saggio: 2 campioni a concentrazioni note di FGF23 sono stati dosati 6 volte.

Inter-saggio: 2 campioni a concentrazioni note di FGF23 sono stati dosati 10 volte da 2 operatori diversi con 4 kit di lotto differente.

Intra-saggio (n=6)	Campione 1	Campione 2
Media (pmol/L)	0,6	10,0
SD (pmol/L)	0,07	0,6
CV (%)	12	6

Inter-saggio (n=10)	Campione 1	Campione 2
Media (pmol/L)	0,6	9,9
SD (pmol/L)	0,06	0,5
CV (%)	10	5

11 CONSIDERAZIONI TECNICHE

- Non mescolare o sostituire i reattivi con altri da lotti o fonti diverse.
- Non scambiare i tappi di flaconi diversi e non usare reattivi da lotti differenti.
- Non usare i reattivi oltre la data di scadenza. Proteggere i reattivi dalla luce solare diretta.
- La soluzione del substrato deve rimanere incolore fino alla dispensazione nei pozzetti.
- Per avere risultati accurati è necessario chiudere ermeticamente le piastre con il copripiastre adesivo.
- Quando si agitano i reattivi evitare la formazione di schiuma.

12 PRECAUZIONI

Tutti i componenti di origine umana sono stati dosati per la determinazione di HIV-Ab e HBsAg e sono stati trovati negativi. Si raccomanda di manipolare e di eliminare i reattivi come potenzialmente infettivi.

I reagenti liquidi contengono una percentuale ≤ 0,1% di Proclin 300 come conservante. Evitare il contatto con cute e mucose. Il Proclin 300 non è tossico alle concentrazioni usate in questo kit. Può usare reazioni cutanee allergiche – evitare contatti con cute o occhi.

- Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.
- Non mangiare, bere, fumare o utilizzare cosmetici quando si utilizzano reattivi per diagnostici.
- Quando si manipolano i reattivi utilizzare sempre guanti monouso.
- L'acido solforico è irritante per occhi e cute. Evitare il contatto con cute e mucose; il prodotto è irritante. In caso di contatto, lavare con abbondante acqua corrente.

**ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETERMINACION CUANTITATIVA DE FGF (C-TERMINAL)
EN SUERO, PLASMA EDTA, PLASMA HEPARINIZADO Y PLASMA CITRATO HUMANO**

1 INTRODUCCIÓN

El FGF23 (factor de crecimiento fibroblástico 23) es una proteína de 32 kDa con 251 aminoácidos que se procesa proteolíticamente entre arginina179 y serina180, para generar fragmentos N-terminales y C-terminales. El FGF23 es secretado principalmente por los osteocitos y controla la homeostasis del fosfato y de la 1,25 (OH)₂ vitamina D.

2 CONTENIDO DEL KIT

CONTENIDO	COMPONENTES DEL KIT	CANTIDAD
PLATE	Tiras de microplaca en soporte, recubiertas con Anti FGF23. Embalaje de bolsa de aluminio con desecante.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampón de lavado concentrado 20x, tapón transparente	1 x 50 mL
ASYBUF	Tampón de ensayo, tapón rojo, listo para usar	1 x 20 mL
AB	Anticuerpo de liebre policlonal biotinilado anti FGF23, tapón verde, listo para usar	1 x 6 mL
STD	Estándares 1-7 (0; 0,2; 0,6; 1,8; 5; 10; 20 pmol/L), recombinantes humanos, FGF23 recombinante en suero humano, tapones blancos, liofilizados	7 viales
CTRL	Controles A + B, tapones amarillos, liofilizados (concentración exacta en las etiquetas de los viales)	2 viales
CONJ	Conjugado, (estreptavidina-HRPO), tapón ámbar, listo para usar.	1 x 13 mL
SUB	Substrato (Solución de TMB), bote ámbar y tapón azul, listo para usar.	1 x 13 mL
STOP	Solución de parada, tapón blanco, lista para usar.	1 x 7 mL

3 MATERIAL ADICIONAL INCLUIDO EN EL KIT

- 2 tiras adhesivas de plástico
- Protocolo QC
- Hoja con el esquema de la placa
- Manual de instrucciones

4 MATERIAL Y EQUIPAMIENTO NECESARIO PERO NO SUMINISTRADO

- Pipetas de precisión calibradas para dispensar 10 µL, 50 µL, 100 µL, 300 µL y puntas desechables.
- Agua destilada o desionizada.
- Se recomienda lavador de placas para lavar, como alternativas pipetas multicanal o un dispensador.
- Frigorífico a 4 °C (2 °C - 8 °C).
- Lector ELISA para absorbancias de 450 nm (con longitud de ondas de corrección de 630 nm).
- Papel gráfico o software para el cálculo de resultados.

5 REACTIVOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRA

Todos los reactivos en el kit son estables a 4 °C (2 °C - 8 °C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta de cada reactivo.

5.1 Preparación/dilución de muestra

Recoger muestras de sangre venosa utilizando tubos de recogida de muestra estandarizados para suero o plasma. Se recomienda centrifugar, para separar el plasma o el suero, tan pronto como sea posible, ej: 20 min a 2000 × g preferiblemente a 4 °C (2 °C - 8 °C).

La muestra de suero o plasma recogida deberá ser medida tan pronto como sea posible. Para mantener las alícuotas almacenadas durante más tiempo se pueden congelar a -25 °C o a temperaturas más bajas. Las muestras pueden someterse a un máximo de 4 ciclos de congelación/descongelación. Las muestras lipémicas o hemolizadas pueden dar resultados erróneos. Las muestras deberán ser mezcladas correctamente antes de cada ensayo. Se recomienda realizar las muestras por duplicado.

Si en la lectura de las muestras se obtienen valores superiores a la lectura del estándar 7, se recomienda diluir las muestras de suero 1:11 (1 + 10, por ejemplo, 10 µL de muestra + 100 µL ASYBUF) y de plasma 1:41 (1 + 40, por ejemplo 10 µL + 400 µL ASYBUF) y analizar de nuevo.

El kit incorpora tampón de ensayo suficiente (ASYBUF) para una dilución 1:41 de 40 muestras.

ASYBUF adicional se puede pedir de forma gratuita bajo petición.

Para información adicional sobre la estabilidad de las muestras contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail drg@drg-diagnostics.de.

5.2 Reconstitución/ Manipulación

WASHBUF (Tampón de lavado):

Diluir el concentrado 1:20, ej. 50 mL WASHBUF + 950 mL de agua destilada. Los cristales en el tampón concentrado pueden disolverse a temperatura ambiente.

El tampón sin diluir es estable a 4 °C (2 °C - 8 °C) hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.

Si el WASHBUF está diluido, se mantiene estable durante un periodo de un mes, como máximo, a 4 °C (2 °C - 8 °C).

Utilizar solo el WASHBUF diluido para el ensayo.

STD (Estándares) y CTRL (Controles):

Pipetear 400 µL de agua destilada o desionizada en cada vial. Dejar a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) durante 15 min. Agitar en vortex.

Los estándares y controles reconstituidos son estables a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) durante 4 horas o a -25 °C hasta la fecha de caducidad marcada en la etiqueta.

STD y CTRL pueden someterse a un máximo de 3 ciclos de congelación/descongelación.

6 PRINCIPIO DEL ENSAYO

Este kit es un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich para la determinación de FGF23 en muestras de suero y plasma humanos.

En un primer paso, se pipetea en los pocillos de las tiras de la microplaca, STD/muestra/CTRL y anticuerpo de detección (anticuerpo policlonal de liebre biotinilado anti-FGF23 humana). Los pocillos están pre-recubiertos con anticuerpo anti-FGF23. La FGF23 presente en el STD/muestra/CTRL se une al anticuerpo pre-recubierto del pocillo y se forma un sándwich con el anticuerpo de detección. A continuación, en la etapa de lavado, todo el material que no se haya unido específicamente se eliminará.

En una segunda etapa, el conjugado (estreptavidina-HRPO) se pipetea en los pocillos y reacciona con el anticuerpo de detección. Después de otra etapa de lavado, se pipetea en los pocillos el sustrato (TMB Tetrametilbencidina). Gracias a la acción catalizadora de la enzima, se produce un cambio de color del sustrato que es directamente proporcional a la cantidad de FGF23 presente. Este cambio de color es detectable utilizando un lector estándar de microplacas de ELISA. Se debe generar una curva dosis-respuesta con las absorbancias (densidad óptica, DO a 450 nm) frente a las concentraciones de los estándares. La concentración de FGF23 en la muestra se determina directamente a partir de esta curva dosis-respuesta.

Ver capítulo 6) PRINCIPLE OF THE ASSAY de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

7 PROTOCOLO DEL ENSAYO

Todos los reactivos y las muestras deben alcanzar la temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) antes de su utilización en el ensayo.

Marcar la posición de STD/muestra/CTRL (Estándar/muestra/Control) en la hoja del esquema de la placa.

Sacar las tiras de la bolsa de aluminio. Almacenar las tiras no utilizadas en la bolsa de aluminio con desecante a 4 °C (2 °C - 8 °C). Las tiras son estables hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta.

1. Añadir 50 µL de STD/muestra/CTRL (Estándar/Muestra/Control) en duplicado en sus pocillos correspondientes.
2. Añadir 50 µL de AB (anticuerpo biotinilado anti FGF23, tapón verde, color verde) en cada pocillo, agitar suavemente con movimiento circular.
3. **Tapar con cuidado e incubar durante la noche (20 h - 24 h) a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C)**
4. Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µL del buffer de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
5. Añadir 100 µL de conjugado (CONJ, tapón ámbar) a cada pocillo.
6. **Tapar con cuidado con las hojas adhesivas e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) en la oscuridad.**
7. Aspirar y lavar los pocillos 5 veces con 300 µL del buffer de lavado diluido (WASHBUF, tapón transparente). Eliminar el tampón de lavado sobrante golpeando suavemente la placa sobre papel absorbente después del último lavado.
8. Añadir 100 µL de sustrato (SUB, tapón azul) a cada pocillo.
9. **Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C - 24 °C) en oscuridad.**
10. Añadir 50 µL de solución de parada (Stop solution) a cada pocillo, agitar suavemente con movimiento circular.
11. Medir la absorbancia inmediatamente a 450 nm y utilizar como referencia un filtro de 630 nm, si está disponible.

8 CÁLCULO DE RESULTADOS

Leer la densidad óptica (OD) de todos los pocillos en un lector de placas usando una longitud de onda de 450 nm (corrección de longitud de onda a 630 nm). Realizar una curva estándar a partir de los valores de las absorbancias de los estándares. Utilizar un programa informático o un papel de representación gráfica. Obtener el valor de la concentración de la muestra a partir de la curva estándar. El ensayo fue evaluado con un algoritmo de 4 PL. Los distintos métodos de ajuste de curvas empleados deben ser evaluados por el usuario. Se deben de considerar distintos factores de dilución.

Ejemplo de típica curva de calibración:

Ver capítulo 8) CALCULATION OF RESULTS de la versión inglesa del manual de instrucciones del ensayo.

El certificado del control de calidad (QC) que se suministra con el kit muestra los resultados del control de calidad final que se realiza con cada lote. Los datos de la densidad óptica obtenidos por los clientes pueden diferir debido a diversos factores y/o debido a una disminución obvia de la intensidad de la señal a lo largo de la vida media del producto. Sin embargo, esto no afecta a la validez de los resultados siempre que se obtenga, como mínimo, un valor de 1,5 para la densidad óptica del estándar de concentración más elevada y los controles estén dentro de su rango de medida (para ver los rangos de los controles ver las etiquetas de sus viales).

9 CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO

Método:	Sandwich ELISA, HRP/TMB, 12x8-tiras			
Tipo de muestra:	Suero, plasma EDTA, plasma heparina, y plasma citrato			
Rango Standards:	0 a 20 pmol/L (7 estándares y 2 controles en matriz de suero humano)			
Factor conversion:	FGF23, C-terminal: 1 pg/mL = 0,133 pmol/L (MW: 7,52 kDa)			
Volúmen de muestra	50 µL / pocillo			
Tiempo de incubación	20 h - 24 h / 1 h / 30 min			
Sensibilidad:	LOD: (0 pmol/L + 3 SD): 0,08 pmol/L; LLOQ: 0,1 pmol/L			
Especificidad:	Este ensayo reconoce FGF23 humano endógeno y recombinante. El ensayo mide ambos fragmentos intactos y C-terminales de FGF23.			
Precisión:	Intra-ensayo (n=6) ≤ 12% , Inter-ensayo (n=10) ≤ 10%			
Spike/Recuperación (recuperación media con añadido de 5 pmol/L rec. FGF23):	Suero (n=13) = 96%	Plasma Heparina (n=8) = 101%		
	Plasma EDTA (n=7) = 97%	Plasma Citrato (n=7) = 100%		
Linealidad de dilución (recuperación media de FGF23 esperada después de diluciones un 1+1; 1+4; 1+7):	Dilución:	1+1	1+3	1+7
	Suero (n=9)	105%	100%	108%
	plasma EDTA (n=4)	103%	103%	106%
	plasma Heparina (n=10)	107%	106%	104%
	plasma Citrate (n=5)	102%	106%	101%
Valores de población aparentemente sana:	Mediana suero (n=35) = 0,8 pmol/L Mediana plasma EDTA (n=22) = 1,3 pmol/L Median plasma heparina (n=22) = 1,2 pmol/L Median plasma citrato (n=30) = 1,4 pmol/L			
	Cada laboratorio debería establecer sus propios rangos de referencia para las muestras que van a ser examinadas. No cambiar el tipo de muestras durante el estudio.			

Para más información sobre las características del ensayo visite, contacte con nuestro servicio de atención al cliente por e-mail drg@drq-diagnostics.de.

10 PRECISION

Intra-ensayo: Para valorar la precisión intra-ensayo se analizaron 6 replicados de 2 muestras de concentraciones conocidas con un mismo lote, por un mismo operador.

Inter-ensayo: Para valorar la precisión inter-ensayo se analizaron 2 muestras de concentraciones conocidas en 10 ensayos con 2 lotes de kit diferentes por 4 operadores distintos.

Intra-ensayo (n=6)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pmol/L)	0,6	10,0
SD (pmol/L)	0,07	0,6
CV (%)	12	6

Inter-ensayo (n=10)	Muestra 1	Muestra 2
Media (pmol/L)	0,6	9,9
SD (pmol/L)	0,06	0,5
CV (%)	10	5

Información detallada sobre el ensayo de FGF23 (C-terminal) ELISA, por ejemplo, datos de validación, comparaciones de matrices y datos de estabilidad, está disponible (drg@drq-diagnostics.de).

11 OBSERVACIONES TÉCNICAS

- No mezclar ni sustituir reactivos procedentes de diferentes lotes o fabricantes.
- No mezclar tapas y tapones de los viales de diferentes reactivos o de reactivos de diferentes lotes.
- No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad.
- Proteger los reactivos de la acción directa de la luz solar.
- Las soluciones de sustrato deberían mantenerse incoloras hasta que se añadan a la microplaca.
- Para asegurar unos resultados más exactos, es necesario tapar adecuadamente la placa con el papel adhesivo durante los pasos de incubación.
- Evitar la formación de espuma al mezclar los reactivos.

12 PRECAUCIONES

Todos los componentes de procedencia humana fueron testados para detectar la presencia de anticuerpos de VIH y Hepatitis B; el resultado fue negativo. Sin embargo, deberían manipularse y desechar como si se tratara de material potencialmente infeccioso.

Todos los reactivos líquidos contienen Proclin 300 al 0,01% como conservante. Evitar el contacto con la piel o con las membranas mucosas. La Proclin 300 no es tóxica en las concentraciones empleadas en este kit. Como puede provocar reacciones alérgicas en la piel, evitar el contacto con la piel o los ojos.

- No pipetear con la boca.
- No comer o beber o aplicarse cosméticos en las zonas de manipulación de los reactivos.
- Evitar el contacto con los reactivos utilizando guantes.
- La solución de parada contiene ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es irritante para los ojos y la piel. Enjuagar con abundante agua si se produce contacto. Evitar el contacto con la piel y con las membranas mucosas. Puede presentarse irritación. Si tiene lugar contacto alguno, enjuagar con abundante agua.

**ELISA POUR LA DETERMINATION QUANTITATIVE DE FGF23 (EXTREMITE C-TERMINALE) HUMAIN
DANS LE SERUM, LE PLASMA EDTA, LE PLASMA HEPARINE ET LE PLASMA CITRATE**

1 INTRODUCTION

FGF23 (facteur 23 de croissance du fibroblaste) est une protéine 32 kDa avec 251 acides aminés qui est traité par protéolyse entre l'arginine¹⁷⁹ et la serine¹⁸⁰ pour générer des fragments à extrémité N-terminale et C-terminale. Le FGF23 est principalement exprimé par les ostéocytes, il contrôle l'homéostasie du phosphate et de la vitamine D 1,25(OH)₂.

2 CONTENU DE LA TROUSSE

CONTENU	COMPOSANTS DE LA TROUSSE	QUANTITÉ
PLATE	Plaques de barrettes de microtitration revêtues d'anticorps anti-FGF23, avec support pour barrettes. Conditionnées en sachets alu avec dessicatif.	12 x 8 tests
WASHBUF	Tampon de lavage, concentré 20x, bouchon transparent	1 x 50 mL
ASYBUF	Tampon de dosage, bouchon rouge, prêt à l'emploi	1 x 20 mL
AB	Anticorps polyclonal biotinylé anti-FGF23 de lièvre, bouchon vert, colorant vert, prêt à l'emploi	1 x 6 mL
STD	Étalons 1-7 (0; 0.2; 0.6; 1.8; 5; 10; 20 pmol/L), FGF23 humain recombinant dans sérum humain, bouchons blancs, lyophilisés	7 ampoules
CTRL	Contrôles A + B, bouchon jaune, lyophilisés (pour la concentration exacte voir étiquette)	2 ampoules
CONJ	Conjugué, (streptavidine-HRPO), flacon marron, bouchon marron, prêt à l'emploi	1 x 13 mL
SUB	Substrat (solution TMB), flacon marron, bouchon bleu, prêt à l'emploi	1 x 13 mL
STOP	Solution stop, bouchon blanc, prêt à l'emploi	1 x 7 mL

3 AUTRE MATÉRIEL INCLUS DANS LA TROUSSE

- 2 bandes de film adhésif
- Protocole de contrôle de la qualité
- Une feuille de protocole
- Notice d'utilisation

4 MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENT NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

- Micropipettes de précision calibrées pour distribuer 10 µL, 50 µL, 100 µL, 300 µL, 400 µL, et embouts jetables
- Eau distillée ou désionisée
- Un laveur de plaques est conseillé, alternatives: pipette multicanaux, distributeurs
- Réfrigérateur à 4 °C (2 °C - 8 °C)
- Photomètre pour microplaques équipé d'un filtre à 450 nm (référence 630 nm)
- Papier millimétré ou logiciel pour le calcul des résultats

5 PRÉPARATION DES RÉACTIFS ET DES ÉCHANTILLONS

Tous les réactifs tels qu'ils sont fournis dans la trousse restent stables à 4 °C (2 °C - 8 °C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette de chaque réactif.

5.1 Préparation/dilution des échantillons

Recueillir du sang veineux dans un tube de prélèvement de sang standard pour sérum ou plasma. Nous recommandons de centrifuger le sang immédiatement, par ex. pendant 20 minutes à 2000 × g à 4 °C (2 °C - 8 °C).

Le sérum ou le plasma obtenu doivent être mesurés le plus tôt possible. À des fins de conservation, les échantillons doivent être fractionnés et conservés à une température égale ou inférieure à -25 °C. Les échantillons restent stables jusqu'à 4 cycles de congélation / décongélation. Les échantillons lipémiques ou hémolysés peuvent fournir des résultats erronés. Bien mélanger les échantillons avant utilisation. Nous recommandons l'utilisation de doublons pour toutes les valeurs.

Si les échantillons indiquent des valeurs plus élevées que STD7, nous recommandons de diluer les échantillons de sérum à 1:11 (1 + 10, par exemple 10 µL d'échantillon + 100 µL d'ASYBUF) et les échantillons de plasma à 1:41 (1 + 40, par exemple 10 µL + 400 µL d'ASYBUF) et de tester à nouveau.

La trousse comprend suffisamment de tampon de dosage (ASYBUF) pour une dilution à 1:41 de 40 échantillons. Il est possible de commander de l'ASYBUF supplémentaire gratuitement.

Pour plus d'informations sur la stabilité des échantillons contacter notre service client par courriel à l'adresse drg@drg-diagnostics.de.

5.2 Reconstitution/Manipulation

WASHBUF (Tampon de lavage):

Diluer le concentré à 1:20, par exemple 50 mL de WASHBUF + 950 mL d'eau distillée. Les cristaux présents dans le concentré de tampon se dissolvent à température ambiante.

Le WASHBUF non dilué reste stable à 4 °C (2 °C - 8 °C) jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Le WASHBUF dilué reste stable jusqu'à un mois à 4 °C (2 °C - 8 °C).

N'utiliser que du WASHBUF dilué pour exécuter le dosage.

STD (Étalons) + CTRL (Contrôles):

Distribuer 400 µL d'eau distillée ou désionisée dans chaque ampoule. Laisser à température ambiante (18 °C - 24 °C) pendant 15 min. Faire tourner doucement. La concentration exacte est imprimée sur l'étiquette.

Les STD et CTRL reconstitués restent stables pendant 4 h à température ambiante (18 °C - 24 °C), ou à -25°C ou moins jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

Les STD et CTRL restent stables jusqu'à 3 cycles de congélation / décongélation.

6 PRINCIPE DU DOSAGE

Cette trousse est un dosage immuno-enzymatique pour la détermination de FGF23 dans des échantillons de sérum et de plasma humains. Dans une première étape, l'échantillon et l'anticorps (anticorps polyclonal biotinylé anti-FGF23 de lièvre) sont distribués dans les puits des barrettes de microtitration, qui sont revêtus d'anticorps anti-FGF23. Le FGF23 présent dans l'échantillon se lie à l'anticorps de capture et forme un sandwich avec l'anticorps de détection. Tout matériel non lié non-spécifique est ensuite éliminé par lavage. Dans une seconde étape, le conjugué (streptavidine-HRPO) est distribué dans les puits. Après un deuxième lavage, le substrat (TMB tétraméthylbenzidine) est distribué dans les puits. Le changement de couleur par catalyse enzymatique du substrat est directement proportionnel à la quantité de FGF23 présente dans l'échantillon. Ce changement de couleur peut être détecté par un photomètre pour microplaques standard.

Voir l'illustration au chapitre 6) *PRINCIPLE OF THE ESSAY* de la version anglaise de la notice.

7 PROTOCOLE DU DOSAGE

Tous les réactifs et échantillons doivent être à température ambiante (18 °C - 24 °C) avant d'être utilisés dans le dosage. Marquer les positions pour STD/SAMPLE/CTRL (Étalon/Échantillon/Contrôle) sur la feuille de protocole.

Sortir les barrettes de microtitration du sachet alu. Les barrettes inutilisées peuvent être conservées dans le sachet alu avec le dessicatif à une température de 4 °C (2 °C - 8 °C). Les barrettes restent stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette.

1. Distribuer 50 µL de STD/Échantillon/CTRL (Étalon/Échantillon/Contrôle) en double dans leurs puits respectifs.
2. Ajouter 50 µL d'AB (anticorps biotinylé anti-FGF23, bouchon vert, colorant vert) dans chaque puits, agiter doucement.
3. **Sceller la plaque avec le band de film adhésif et incubé pendant une nuit (20 h - 24 h) à température ambiante (18 °C - 24 °C).**
4. Aspirer le contenu des puits et les laver 5 fois avec 300 µL de WASHBUF dilué (Tampon de lavage, bouchon transparent). Éliminer tout WASHBUF restant en tapant fortement la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
5. Ajouter 100 µL de CONJ (Conjugué, bouchon orange) dans chaque puits.
6. **Sceller la plaque avec le band de film adhésif et incubé pendant 1 heure à température ambiante (18 °C - 24 °C) dans l'obscurité.**
7. Aspirer le contenu des puits et les laver 5 fois avec 300 µL de WASHBUF dilué (Tampon de lavage, bouchon transparent). Éliminer tout WASHBUF restant en tapant fortement la plaque contre une serviette en papier après le dernier lavage.
8. Ajouter 100 µL de SUB (Substrat, bouchon bleu) dans chaque puits, agiter doucement.
9. **Incuber pendant 30 minutes à température ambiante (18 °C - 24 °C) dans l'obscurité.**
10. Ajouter 50 µL de STOP (Solution stop, bouchon blanc) dans chaque puits, agiter doucement.
11. Mesurer immédiatement l'absorbance à 450 nm avec une référence à 630 nm, si possible.

8 CALCUL DES RÉSULTATS

Mesurer la densité optique (DO) de chaque puits avec un photomètre pour microplaques à filtre de 450 nm (référence 630 nm). Construire la courbe d'étalonnage à partir des valeurs de DO des étalons. Utiliser un logiciel prévu à cet effet ou du papier millimétré vendu couramment dans le commerce. Obtenir la concentration des échantillons à partir de cette courbe d'étalonnage. Le système de dosage a été évalué avec logit-log et un algorithme d'ajustement à 4 paramètres 4PL. Différents algorithmes d'ajustement doivent être évalués par l'utilisateur. Les facteurs de dilution respectifs doivent être pris en compte dans le calcul de la concentration finale de l'échantillon.

Exemple de courbe de STD typique :

Voir au chapitre 8) *CALCULATION OF RESULTS* dans la version anglaise de la notice d'utilisation.

Le protocole de contrôle qualité fourni avec la trousse présente les résultats du contrôle qualité de la version finale pour chaque lot de trousse. Les données de densité optique obtenues par les utilisateurs peuvent être différentes en raison de diverses influences et/ou de la diminution normale de l'intensité du signal pendant la durée de conservation en emballage non ouvert. Cependant, cela n'affecte pas la validité des résultats tant que la densité optique de l'étalon ayant la concentration la plus élevée est au moins égale à 1,50 et que les valeurs de CTRL sont situées dans une plage acceptable (pour les plages cibles, voir les étiquettes).

9 CARACTÉRISTIQUES DU DOSAGE

Méthode:	ELISA sandwich, HRP/TMB, barrettes de 12x8 puits			
Type d'échantillon:	Sérum, plasma EDTA, plasma héparine et plasma citrate			
Gamme d'étalonnage:	0 à 20 pmol/L (7 étalons et 2 contrôles dans une matrice de sérum humain)			
Facteur de conversion:	FGF23 (Extrémité C-terminale): 1 pg/mL = 0,133 pmol/L (MW: 7,52 kDa)			
Volume d'échantillon:	50 µL / puits			
Temps d'incubation:	20 h - 24 h / 1 h / 30 min			
Sensibilité:	LOD (0 pmol/L + 3 SD): 0,08 pmol/L; LLOQ: 0,1 pmol/L			
Spécificité:	Ce dosage reconnaît le FGF23 humain endogène et recombinant. Il mesure le FGF23 intact ainsi que ses fragments à extrémité C-terminale.			
Précision:	Intra-série (n=6) ≤ 12%, Inter-séries (n=10) ≤ 10%			
Dopage/Récupération (récupération moyenne avec 5 pmol/L de FGF23 réc.):	Sérum (n=13): 96%	Plasma héparine (n=8): 101%		
	Plasma EDTA (n=7): 97%	Plasma citrate (n=7): 100%		
Linéarité de la dilution (récupération moyenne de FGF23 attendu après une dilution 1+1; 1+3; 1+7):	Dilution:	1+1	1+3	1+7
	Sérum (n=9)	105%	100%	108%
	Plasma EDTA (n=4)	103%	103%	106%
	Plasma héparine (n=10)	107%	106%	104%
	Plasma citrate (n=5)	102%	106%	101%
Valeurs d'individus apparemment en bonne santé :	Valeur médiane Sérum (n=35): 0,8 pmol/L			
	Valeur médiane Plasma EDTA (n=22): 1,3 pmol/L			
	Valeur médiane Plasma héparine (n=22): 1,2 pmol/L			
	Valeur médiane Plasma citrate (n=30): 1,4 pmol/L			
	Chaque laboratoire doit établir sa propre gamme de référence pour les échantillons en cours d'évaluation. Ne pas modifier le type d'échantillon pendant l'étude.			

Pour plus d'informations sur les caractéristiques du dosage, contacter notre service client par courriel à l'adresse drg@drg-diagnostics.de.

10 PRÉCISION

Intra-série: 2 échantillons de concentration connue ont été testés 6 fois dans 1 lot de trousse par 1 opérateur.

Inter-séries: 2 échantillons de concentration connue ont été testés 10 fois dans 2 lots de trousse différents par 4 opérateurs différents.

Intra-série (n=6)	Échantillon 1	Échantillon 2
Moyenne (pmol/L)	0,6	10,0
SD (pmol/L)	0,07	0,6
CV (%)	12	6

Inter-séries (n=10)	Échantillon 1	Échantillon 2
Moyenne (pmol/L)	0,6	9,9
SD (pmol/L)	0,06	0,5
CV (%)	10	5

Des informations détaillées sur le dosage ELISA FGF23 (extrémité C-terminale), par ex. les caractéristiques de performance du dosage, les comparaisons de matrices, ainsi que les données de stabilité, sont disponibles (drg@drg-diagnostics.de).

11 CONSEILS TECHNIQUES

- Ne pas mélanger les réactifs de lots ou de tests différents.
- Ne pas intervertir les embouts ou bouchons de réactifs différents.
- Ne pas utiliser les réactifs au-delà de leur date de péremption.
- Protéger les réactifs contre les rayons du soleil.
- La solution de substrat doit rester incolore jusqu'au moment où elle est ajoutée à la plaque.
- Pour garantir des résultats précis, il est nécessaire de bien sceller les plaques pendant les étapes d'incubation.
- Éviter de faire mousser en mélangeant les réactifs.

12 PRÉCAUTIONS

Tous les produits d'origine humaine utilisés dans ce test ont été testés contre le VIH-Ab et l'AgHBs avec des résultats négatifs.

Néanmoins, ils doivent être manipulés et éliminés comme étant susceptibles de transmettre des maladies infectieuses. Tous les réactifs liquides contiennent $\leq 0,1\%$ de Proclin 300 comme conservateur. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses.

Le Proclin 300 n'est pas toxique aux concentrations utilisées dans cette trousse. Il peut toutefois provoquer des réactions cutanées allergiques - éviter tout contact avec la peau et les yeux.

- Ne pas pipetter avec la bouche.
- Ne pas manger, boire, fumer ou appliquer des produits cosmétiques pendant la manipulation des réactifs.
- Porter des gants, des lunettes et une blouse de laboratoire pendant l'exécution du dosage.
- L'acide sulfurique est irritant pour les yeux et la peau. Éviter tout contact avec la peau et les muqueuses. Irritations possibles. Rincer abondamment à l'eau claire en cas de contact !

13 LITERATURE / LITERATUR / BIBLIOGRAFIA / BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHIE

1. The Use of Fibroblast Growth Factor 23 Testing in Patients with Kidney Disease. ER Smith, Clin J Am Soc Nephrol 2014; 9: 1283-1303.
 2. Management of hyperphosphataemia in chronic kidney disease – challenges and solutions. Ketteler M et al., Clinical Kidney Journal, 2013; 6: 128-136.
 3. Regulation of serum phosphate. E Lederer, J Physiol 2014; 592: 3985-3995.
- Fibroblast growth factor 23. Smith ER et al., Annals of Clin Biochemistr 2014; 51: 203-227

ASSAY PROTOCOL and CHECKLIST**Preparation of REagents:**

- ☐ Bring all reagents to room temperature (18 °C - 24 °C).
- ☐ Prepare reagents and samples as instructed.
- ☐ Bring unused and prepared components to the storage temperature mentioned in the package insert.
- ☐ Take microtiter strips out of the aluminium bag and mark positions on the protocol sheet.

Test ProceDure:

- ☐ Step 1) Pipette 50 µL STD/SAMPLE/CTRL (standard/sample/control) into all wells.
- ☐ Step 2) Add 50 µL AB (biotinylated anti FGF23, green cap) into all wells, mix gently.
- ☐ **Step 3) Cover tightly and incubate over night (20-24 h) at room temperature (18 °C - 24 °C).**
- ☐ Step 4) Aspirate and wash wells with 300 µL WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ☐ Step 5) Add 100 µL CONJ (Conjugate, amber cap) into each well.
- ☐ **Step 6) Cover tightly and incubate for 1 hour at room temperature (18 °C - 24 °C), in the dark.**
- ☐ Step 7) Aspirate and wash wells with 300 µL WASHBUF (Wash buffer) five times. Remove remaining buffer by hitting plate against paper towel.
- ☐ Step 8) Add 100 µL SUB (Substrate, blue cap) into each well.
- ☐ **Step 9) Incubate for 30 minutes at room temperature (18 °C - 24 °C), in the dark.**
- ☐ Step 10) Add 50 µL STOP (Stop solution, white cap) into each well, mix gently.
- ☐ Step 11) Read Optical Density at 450 nm with reference 630 nm, if available.

SYMBOLS USED

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