



IVD

CE

E2-RIA-CT

KIP0629

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

History

Summary of change:

Current Version: 230123
New logo

Read entire protocol before use.

E2-RIA-CT

I. INTENDED USE

Radioimmunoassay for the *in vitro* quantitative measurement of human Estradiol (E2) in serum.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource E2-RIA-CT Kit
- B. **Catalog number :** KIP0629 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CLINICAL BACKGROUND

A. Biological activity

17-beta-estradiol (E2) is a C-18 steroid hormone (molecular weight 272.4 Da) produced mainly by the ovary and placenta, and in small amounts by adrenals and testes. Estradiol is in equilibrium with estrone, which can be converted to estriol by the liver and placenta.

B. Clinical applications

Like for LH-FSH-progesterone, measurement of estradiol concentration in serum, peritoneal fluid and follicular fluid is an essential biochemical tool for the investigation of fertility, tumor and sexual diseases, and disorders of hypothalamic/pituitary/gonadal axis, for example :

- . To detect the follicular phase;
- . To check the effectiveness of the induction of ovulation (with ultrasound) and the level of E2 in follicular fluid makes it possible to detect normal or dysfunctional ovulation induction (the empty follicle syndrome may reflect a dysfunctional ovulation induction);
- . To diagnose the luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome (by the estimation of 17 beta-estradiol and progesterone levels in peritoneal fluid);
- . To aid in the diagnosis of breast tumors (total estrogens - E1-E2 - and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity are significantly higher in malignant than in non malignant breast tissues);
- . With LH-FSH and E2 levels, it is possible to suspect a Stein Cohen-Leventhal syndrome;
- . Other areas of investigation are : premature adrenarache, gynecomastie and menopausal period.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

A fixed amount of ¹²⁵I labelled steroid competes with the steroid to be measured present in the sample or in the calibrator for a fixed amount of antibody sites immobilized on the wall of a polystyrene tube. Neither extraction nor chromatography is required because of the high specificity of the coated antibodies. After 3 hours incubation at 37°C, an aspiration step terminates the competition reaction. The tubes are then washed with 3 ml of washing solution and aspirated. A calibration curve is plotted and the E2 concentrations of the samples are determined by dose interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Reconstitution			
Tubes coated with anti E2	2 x 48	Ready for use			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> TRACER: ¹²⁵ Iodine labelled E2 (HPLC grade) in ethanol solution	Ag	¹²⁵ I	CONC	1 vial 1 ml 142 kBq	Transfer <i>quantitatively</i> the ethanol solution in the tracer buffer
Ag	¹²⁵ I	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tracer Buffer with bovine gelatin and azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 vial 53 ml	Ready for use	
TRACER	BUF				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Zero calibrator in human serum and azide (<0.5%)	CAL	0	1 vial 0,5 ml	Ready for use	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibrators E2 N = 1 to 6 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (<0.5%)	CAL	N	6 vials 0,5 ml	Ready for use	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Wash solution (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Samples diluent: human serum and azide (<0.1%)	DIL	SPE	1 vial 2.5 ml	Ready for use	
DIL	SPE				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controls - N = 1 or 2 in human plasma and thymol	CONTROL	N	2 vials lyophilized	Add 0.5 ml distilled water	
CONTROL	N				

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

The following material is required but not provided in the kit:

- Distilled water
- Pipettes for delivery of: 50µl and 500µL (the use of accurate pipettes with disposable plastic tips is recommended)
- Vortex mixer
- Magnetic stirrer
- Water bath at 37°C
- 5 ml automatic syringe (Cornwall type) for washing
- Aspiration system (optional)
- Any gamma counter capable of measuring ¹²⁵I may be used (minimal yield 70%).

VII. REAGENT PREPARATION

- Tracer** : Transfer quantitatively the ethanol solution into the tracer buffer and mix.
- Controls**: Reconstitute the controls with 0.5 ml distilled water.
- Working Wash solution**: Prepare an adequate volume of Working Wash solution by adding 69 volumes of distilled water to 1 volume of Wash Solution (70x). Use a magnetic stirrer to homogenize. Discard unused Working Wash solution at the end of the day.

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

- Before opening or reconstitution, all kit components are stable until the expiry date, indicated on the label, if kept at 2 to 8°C.
- After reconstitution, controls are stable for one week at 2 to 8°C. For longer storage periods, aliquots should be made and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid successive freezing and thawing.
- Freshly prepared Working Wash solution should be used on the same day.
- After dilution, the tracer is stable until expiry date, if kept in the original well-closed vial at 2 to 8°C.
- Alterations in physical appearance of kit reagents may indicate instability or deterioration.

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at 2-8°C.
- If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.
- Dilution of high concentration samples: the provided diluent contains a small amount of Estradiol, and has to be tested to determinate this concentration. This value has to be subtracted from the concentration of the samples before multiplying the results by the dilution factor.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

Do not use the kit or components beyond expiry date. Do not mix materials from different kit lots. Bring all the reagents to room temperature prior to use. Thoroughly mix all reagents and samples by gentle agitation or swirling. In order to avoid cross-contamination, use a clean disposable pipette tip for the addition of each reagent and sample. High precision pipettes or automated pipetting equipment will improve the precision. Respect the incubation times. Prepare a calibration curve for each run, do not use data from previous runs.

B. Procedure

- Label coated tubes in duplicate for each calibrator, control and sample. For the determination of total counts, label 2 normal tubes.
- Briefly vortex calibrators, controls and samples and dispense 50µl of each into respective tubes.
- Dispense 500µl of ¹²⁵Iodine labelled E2 into each tube, including the uncoated tubes for total counts.
- Shake the tube rack gently by hand to liberate any trapped air bubbles.
- Incubate for 3 hours at 37°C in a water bath.
- Aspirate (or decant) the content of each tube (except total counts). Be sure that the plastic tip of the aspirator reaches the bottom of the coated tube in order to remove all the liquid.
- Wash tubes with 3 ml Working Wash solution (except total counts) and aspirate (or decant). Avoid foaming during the addition of the Working Wash solution.
- Let the tubes stand upright for two minutes and aspirate the remaining drop of liquid.
- Count tubes in a gamma counter for 60 seconds.

XI. CALCULATION OF RESULTS

- Calculate the mean of duplicate determinations.
- Calculate the bound radioactivity as a percentage of the binding determined at the zero calibrator point (0) according to the following formula :

$$B/B0(\%) = \frac{\text{Counts (Calibrator or sample)}}{\text{Counts (Zero Calibrator)}} \times 100$$

- Using a 3 cycle semi-logarithmic or logit-log graph paper, plot the (B/B0(%)) values for each calibrator point as a function of the E2 concentration of each calibrator point. Reject obvious outliers.
- Computer assisted methods can also be used to construct the calibration curve. If automatic result processing is used, a 4-parameter logistic function curve fitting is recommended.
- By interpolation of the sample (B/B0 (%)) values, determine the E2 concentrations of the samples from the calibration curve.
- For each assay, the percentage of total tracer bound in the absence of unlabelled E2 (B0/T) must be checked.

XII. TYPICAL DATA

The following data are for illustration only and should never be used instead of the real time calibration curve.

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Total count	69089	
Calibrator		
0 pg/ml	29372	100.0
9 pg/ml	25237	85.9
27 pg/ml	21374	72.7
92 pg/ml	15669	53.4
430 pg/ml	8527	29.0
2200 pg/ml	2607	8.9
3900 pg/ml	1676	5.7

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty two zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators.

The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 2.7 pg/ml.

B. Specificity

The percentages of cross-reaction estimated by comparison of the concentration yielding a 50% inhibition are respectively:

Compound	Cross-Reactivity (%)
Estrone	1.0
Estriol	0.6
Ethinylestradiol	0.2
Progesterone	<0.0002
Testosterone	<0.001
Androstenedione	<0.001
DHEA-sulphate	<0.0002
Estradiol-17-glucuronide	<0.2
Cortisol	<0.001
Equilin	<0.1
Estradiol-17-Valerate	<0.1
Norgestrel	<0.0004
Androstendiol	0.001

C. Precision

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6.4	8.0	A	23	79 ± 11	13.9
B	20	141 ± 7.9	5.6	B	23	249 ± 26	10.4
C	20	249 ± 11.7	4.7				

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST

Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)	Recovered (%)
1/1	1400.3	1387.3	100
1/2	700.2	659.0	96
1/4	350.1	358.0	106
1/8	175.1	158.0	98
1/16	87.5	64.9	89
1/32	43.8	29.3	97
1/64	21.9	11.9	114

The sample was diluted with the provided diluent. The endogenous Estradiol in the diluent was 13 pg/ml and this value was deducted from the sample concentration before applying the dilution factor.

Measured and theoretical concentrations were consistent:

$$Y (\text{measured}) = 0.99X (\text{theoretical}) - 0 ; R^2 = 0.999$$

RECOVERY TEST

Sample	Added E2 (pg/ml)	Theoretical E2 (pg/ml)	Measured E2 (pg/ml)	Recovered (%)
1	0	12.8	12.8	NA
	4.5	17.3	18.3	106
	13.5	26.3	22.3	85
	46.0	58.8	54.4	93
	215	227.8	207	91
	1100	1112.8	1104	99
	1950	1962.8	2259	115

Measured and theoretical concentrations were consistent:

$$- \text{Sample 1: } Y (\text{measured}) = 1.11X (\text{theoretical}) + 0 ; R^2 = 0.999$$

Conversion factor :

From ng/ml to nmol/L : x 3.68

From nmol/L to ng/ml : x 0.272

The concentrations of the calibrators are determined with the ID-GC/MS reference method.

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

As shown hereafter, assay results remain accurate even when a sample is dispensed 40 minutes after the calibrator has been added to coated tubes.

TIME DELAY

Serum (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

- If the results obtained for Control 1 and/or Control 2 are not within the range specified on the vial label, the results cannot be used unless a satisfactory explanation for the discrepancy has been given.
- If desirable, each laboratory can make its own pools of control samples, which should be kept frozen in aliquots.
- Acceptance criteria for the difference between the duplicate results of the samples should rely on Good Laboratory Practises.

XV. REFERENCE INTERVALS

These values are given only for guidance; each laboratory should establish its own normal range of values.

	Concentration range (2.5 to 97.5% percentiles) (pg/ml)	Median concentration (pg/ml)	Number of subjects
Normal males	8 - 66	27	36
Normal Females			
. Follicular phase (day -10 to -3)	35 - 147	69	49
. Preovulatory phase (day -1 & 0)	70 - 490	135	13
. Luteal phase (day 3 to 10)	43 - 217	105	35
. Postmenopausal	19 - 49	31	39

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ¹²⁵I (half-life: 60 days) ,emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products

are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

All radioactive handling should be executed in a designated area, away from regular passage. A logbook for receipt and storage of radioactive materials must be kept in the lab. Laboratory equipment and glassware, which could be contaminated with radioactive substances, should be segregated to prevent cross contamination of different radioisotopes.

Any radioactive spills must be cleaned immediately in accordance with the radiation safety procedures. The radioactive waste must be disposed of following the local regulations and guidelines of the authorities holding jurisdiction over the laboratory. Adherence to the basic rules of radiation safety provides adequate protection.

The human blood components included in this kit have been tested by European approved and/or FDA approved methods and found negative for HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 and 2. No known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures.

All animal products and derivatives have been collected from healthy animals. Bovine components originate from countries where BSE has not been reported. Nevertheless, components containing animal substances should be treated as potentially infectious.

Avoid any skin contact with reagents (sodium azide as preservative). Azide in this kit may react with lead and copper in the plumbing and in this way form highly explosive metal azides. During the washing step, flush the drain with a large amount of water to prevent azide build-up.

Do not smoke, drink, eat or apply cosmetics in the working area. Do not pipette by mouth. Use protective clothing and disposable gloves.

XVII. BIBLIOGRAPHY

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

	TOTAL COUNTS µl	CALIBRATORS µl	SAMPLE(S) CONTROLS µl
Calibrators (0-6)	-	50	-
Samples, controls	-	-	50
Tracer	500	500	500
Incubation	3 hours at 37°C in a water bath		
Separation	-	aspirate 3.0 ml	
Working Wash solution		aspirate carefully	
Separation			
Counting	Count tubes for 60 seconds		

Other translations of this Instruction for Use can be downloaded from our website: <https://www.diasource-diagnostics.com/>



Lire entièrement le protocole avant utilisation.

E2-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

Trousse de dosage radio-immunologique pour la mesure quantitative *in vitro* de l'Oestradiol (E2) dans le sérum humain.

II. INFORMATIONS GENERALES

- A. **Nom du produit :** DIAsource E2-RIA-CT kit
- B. **Numéro de catalogue:** KIP0629 : 96 tests
- C. **Fabriqué par :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgique.

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

Le 17-beta-oestradiol (E2) est une hormone stéroïde à 18 carbones (poids moléculaire 272,4 Da) produite principalement par les ovaires et le placenta, et en petites quantités par les surrénales et le testicule. L'oestradiol est en équilibre avec l'oestrone, qui peut être converti en oestriol par le foie et le placenta.

B. Application clinique


Comme pour la progestérone LH-FSH, la mesure de la concentration en oestradiol dans le sérum, le fluide péritonéale et le fluide folliculaire est un moyen biochimique essentiel pour l'investigation de la fertilité, des tumeurs et des maladies sexuelles, et des dysfonctionnements de l'axe hypothalamique/pituitaire/gonadique, par exemple:

- . Détecter la phase folliculaire;
- . Vérification de l'efficacité de l'induction de l'ovulation (avec ultrason) et du taux en E2 dans le fluide folliculaire rend possible la détection d'induction de l'ovulation normale ou anormale (le syndrome du follicule vide peut indiquer une induction de l'ovulation anormale);
- . Pour le diagnostic du syndrome du follicule non rompu lutéinisé (LUF) (par l'évaluation des taux en 17 beta-oestradiol et en progestérone dans le fluide péritonéale);
- . Comme moyen de diagnostic pour les tumeurs du sein (le total des oestrogènes - E1-E2 – et l'activité 17 beta-hydroxystéroïde déhydrogénase sont plus hauts dans les tissus malins que dans les tissus non-malins du sein);
- . Avec les taux en LH-FSH et en E2, il est possible de vérifier un syndrome de Stein Cohen-Leventhal;
- . D'autres domaines d'investigation sont: l'adrénarchie prématurée, la gynécomastie et la période ménopausique

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

Une quantité fixe d'E2 marquée à ^{125}I est en compétition avec la E2 à mesurer et présente dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité fixe d'anticorps immobilisés sur les parois du tube en polystyrène. Aucune extraction ni chromatographie n'est requise à cause de la haute spécificité de l'anticorps fixé. Après 3 heures d'incubation à 37°C, le liquide est aspiré pour terminer la réaction de compétition. Les tubes sont lavés avec 3 ml de Solution de Lavage et aspirés à nouveau. Une courbe de calibration est réalisée et la concentration en E2 des échantillons est déterminée par interpolation de la dose sur la courbe de calibration.

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti E2	2 x 48	Prêt à l'emploi			
<table border="1" data-bbox="140 674 347 712"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>TRACEUR: E2 marquée à ^{125}I Iodine (grade HPLC) dans une solution ethanol.</p>	Ag	^{125}I	CONC	1 flacon 1 ml 142 kBq	Transférer quantitativement la solution d'éthanol dans le Tampon Traceur.
Ag	^{125}I	CONC			
<table border="1" data-bbox="124 824 347 880"> <tr> <td>TRACEUR</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Tampon Traceur avec de la gélatine bovine et de l'azide. (<0,1%)</p>	TRACEUR	BUF	1 flacon 53 ml	Prêt à l'emploi	
TRACEUR	BUF				
<table border="1" data-bbox="140 958 284 992"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Calibrateur zéro dans du sérum humain et de l'azide. (<0,5%)</p>	CAL	0	1 flacon 0,5 ml	Prêt à l'emploi	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="140 1059 284 1093"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibrateurs E2 N = 1 à 6 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et de l'azide (<0,5%)</p>	CAL	N	6 flacons 0,5 ml	Prêt à l'emploi	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="124 1205 411 1238"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Solution de lavage (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="124 1339 323 1373"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>Diluant pour échantillons en sérum humain avec de l'azide (<0,1%)</p>	DIL	SPE	1 flacons 2,5 ml	Prêt à l'emploi	
DIL	SPE				
<table border="1" data-bbox="124 1485 323 1518"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Contrôles - N = 1 ou 2 dans du plasma humain et du thymol</p>	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Ajouter 0,5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N				

VI. MATERIEL NON FOURNI

Le matériel mentionné ci-dessous est requis mais non fourni avec la trousse:

- Eau distillée
- Pipettes pour distribuer: 50 μl et 500 μl (l'utilisation de pipettes précises et de pointes jetables en plastique est recommandée)
- Agitateur vortex
- Agitateur magnétique
- Bain d'eau à 37°C
- Seringue automatique de 5 ml (type Cornwall) pour les lavages
- Système d'aspiration
- Tout compteur gamma capable de mesurer ^{125}I peut être utilisé (rendement minimum 70%).

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- Traceur** : Transférer quantitativement la solution d'éthanol dans le tampon traceur et mélanger.
- Contrôles** : Reconstituer les contrôles avec 0,5 ml d'eau distillée.
- Solution de Lavage** : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

- Avant l'ouverture ou la reconstitution, tous les composants de la trousse sont stables jusqu'à la date d'expiration, indiquée sur l'étiquette, si la trousse est conservée entre 2 et 8°C.
- Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant une semaine entre 2 et 8°C. Pour de plus longues périodes de stockage, des aliquots devront être réalisés et ceux-ci seront gardés à -20°C. Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- La Solution de Lavage préparée doit être utilisée le jour même.
- Après dilution, le traceur est stable jusqu'à la date d'expiration, si celui-ci est conservé entre 2 et 8°C dans le flacon d'origine correctement fermé.
- Des altérations dans l'apparence physique des réactifs de la trousse peuvent indiquer une instabilité ou une détérioration.

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.
- Dilution des échantillons de valeur élevée : le diluant contient une faible quantité d'estradiol et doit être testé pour connaître la concentration endogène d'estradiol. Cette concentration doit être déduite de la concentration de l'échantillon mesurée avant multiplication par le facteur de dilution.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. **Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation.**

Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

- Identifier les tubes recouverts fournis dans la trousse en double pour chaque calibrateur, contrôle, échantillon. Pour la détermination de l'activité totale, identifier 2 tubes non recouverts.
- Agiter au vortex brièvement les calibrateurs, les contrôles et les échantillons. Puis distribuer 50 μl de chacun d'eux dans leurs tubes respectifs.
- Distribuer 500 μl d'E2 marquée à ^{125}I dans chaque tube, y compris les tubes sans anticorps pour la détermination de l'activité totale.
- Agiter gentiment le portoir de tube pour libérer toute bulle d'air emprisonnée.
- Incuber pendant 3 heures à 37°C au bain-marie.
- Aspirer le contenu de chaque tube (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale). Assurez-vous que la pointe utilisée pour aspirer le liquide des tubes atteigne le fond de chacun d'eux pour éliminer toute trace de liquide.
- Laver les tubes avec 3 ml de Solution de Lavage (à l'exception des tubes utilisés pour la détermination de l'activité totale) et aspirer. Eviter la formation de mousse pendant l'addition de la Solution de Lavage.
- Laisser les tubes droits pendant 2 minutes et aspirer le reste de liquide.
- Placer les tubes dans un compteur gamma pendant 60 secondes pour quantifier la radioactivité.

XI. CALCUL DES RESULTATS

1. Calculer la moyenne de chaque détermination réalisée en double.
2. Calculer la capacité de liaison de l'essai comme un pourcentage de liaison déterminé au point de calibration (0) en suivant la formule ci-dessous :

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{moyenne des cpm (CAL ou échantillon } n)}{\text{moyenne des cpm (CAL 0)}} \times 100$$

3. Utiliser un "3 cycle semi-logarithmic" ou un papier graphique "logit-log", porter en ordonnée les valeurs exprimées en pourcentage de liaison (B/B₀(%)) de chaque point de calibration et en abscisse leur concentration respective en E2, écarter les valeurs aberrantes.
4. Des méthodes informatiques peuvent aussi être utilisées pour construire la courbe de calibration. Si un système d'analyse de traitement informatique des données est utilisé, il est recommandé d'utiliser la fonction « 4 paramètres » du lissage de courbes.
5. L'interpolation des valeurs de chaque échantillon (B/B₀(%)) détermine les concentrations en E2 à partir de la courbe de calibration.
6. Pour chaque essai, le pourcentage total de traceur lié en absence de E2 non marquée (B₀/T) doit être vérifié.

XII. DONNEES TYPES

Les données représentées ci-dessous sont données pour information et ne peuvent jamais être utilisées à la place d'une courbe de calibration.

E2	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	69089	
Calibrateur		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt-quatre calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d'autres calibrateurs.

La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 2,7 pg/ml.

B. Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par la comparaison de la concentration (indiquant une inhibition de 50 %) est respectivement :

Composé	Réactivité Croisée (%)
Estrone	1,0
Estriol	0,6
Ethynylestradiol	0,2
Progesterone	<0,0002
Testosterone	<0,001
Androstenedione	<0,001
DHEA-sulphate	<0,0002
Estradiol-17-glucuronide	<0,2
Cortisol	<0,001
Equilin	<0,1
Estradiol-17-Valerate	<0,1
Norgestrel	<0,0004
Androstendiol	0,001

C. Précision

INTRA-ESSAI

INTER-ESSAI

Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Sérum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION

Dilution	Concent. Théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)	Recupération (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

L'échantillon a été dilué avec le diluant fourni. La concentration endogène en estradiol mesurée était de 13 pg/ml et à été déduite de la valeur mesurée de l'échantillon avant application du facteur de dilution.

Les concentrations mesurées et théoriques étaient cohérentes:

$$Y (\text{mesurées}) = 0,99X (\text{théoriques}) - 0 \quad R^2 = 0,999$$

TEST DE RECUPERATION

Echantillon	E2 ajouté (pg/ml)	E2 théorique (pg/ml)	E2 mesurée (pg/ml)	Recupération (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Les concentrations mesurées et théoriques étaient cohérentes:

$$- \text{Échantillons 1 : } Y (\text{mesurées}) = 1,11X (\text{théoriques}) + 0 \quad R^2 = 0,999$$

Facteur de conversion :

$$\begin{aligned} \text{De ng/ml à nmol/L :} & \quad \times 3,68 \\ \text{De nmol/L à ng/ml :} & \quad \times 0,272 \end{aligned}$$

Les concentrations des calibrateurs sont déterminées avec la méthode de référence ID-GC/MS.

E. Délai entre la distribution du dernier calibrateur et celle de l'échantillon

Comme montré ci-dessous, les résultats d'un essai restent précis même quand un échantillon est distribué 40 minutes après que le calibrateur ait été ajouté aux tubes avec l'anticorps.

DELAI

Sérum pg/ml	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

- Si les résultats obtenus pour le(s) contrôle(s) 1 et/ou 2 ne sont pas dans l'intervalle spécifié sur l'étiquette du flacon, les résultats ne peuvent pas être utilisés à moins que l'on ait donné une explication satisfaisante de la non-conformité.
- Chaque laboratoire est libre de faire ses propres stocks d'échantillons contrôlés, lesquels doivent être congelés aliquotés.
- Les critères d'acceptation pour les écarts des valeurs en duplicat des échantillons doivent être basés sur les pratiques de laboratoire courantes.

XIV. VALEURS ATTENDUES

Les valeurs sont données à titre d'information; chaque laboratoire doit établir ses propres écarts de valeurs.

	Portée de la concentration (2,5 à 97,5% percentiles) (pg/ml)	Concentrations moyennes (pg/ml)	Nombre de sujets
Hommes normaux	8 - 66	27	36
Femmes normales			
. Phase folliculaire (jour -10 à -3)	35-147	69	49
. Phase préovulatoire (jour -1 & 0)	70 - 490	135	13
. Phase lutéale (jour 3 à 10)	43 - 217	105	35
. Postménopausique	19 - 49	31	39

XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité

Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.

Cette trousse contient de ^{125}I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).

Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.

Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.

Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate

Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.

Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.

L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

Ne pas fumer, ni boire, ni manger ni appliquer de produits cosmétiques dans les laboratoires où des produits radioactifs sont utilisés. Ne pas pipeter avec la bouche. Utiliser des vêtements protecteurs et des gants à usage unique.

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil. and Steril., 48, 1, 94-97.
2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

	ACTIVITE TOTALE (μl)	CALIBRA -TEURS (μl)	ECHANTILLON(S) CONTROLES (μl)
Calibrateurs (0 à 6)	-	50	-
Echantillons, contrôles	-	-	50
Traceur	500	500	500
Incubation	3 heures à 37°C au bain-marie		
Séparation	-	aspirer 3,0 ml	
Solution de Lavage		aspirer avec précaution	
Séparation			
Comptage	Compter les tubes pendant 60 secondes		

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

E2-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

Ein Radio-Immunoassay für die quantitative *in vitro* Bestimmung von humanem Östradiol (E2) in Serum.

II. ALLGEMEINE INFORMATION

- A. **Handelsbezeichnung :** DIAsource E2-RIA-CT Kit
- B. **Katalognummer :** KIP0629 : 96 Tests
- C. **Hergestellt von:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgien.

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

Für Deutschland : Kostenfreie Rufnummer : 0800 1 00 85 74 - Kostenfreie Faxnummer : 0800 1 00 85 75

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

17-beta-Östradiol (E2) ist ein C-18 Steroidhormon (Molekulargewicht: 272,4 Da), das vor allem von Eierstöcken und Plazenta und in geringen Mengen auch von Nebennieren und Hoden produziert wird. Östradiol befindet sich im Gleichgewicht mit Östron, das durch Leber und Plazenta in Östriol konvertiert werden kann.

B. Klinische Anwendungen


Wie für LH-FSH-Progesteron ist die Messung der Östradiolkonzentration in Serum, Peritonealflüssigkeit und Follikelflüssigkeit ein wichtiges biochemisches Instrument zur Untersuchung von Fruchtbarkeit, Tumoren und sexuellen Fehlfunktionen sowie Störungen der Hypothalamus/Hypophyse/Gonaden-Achse, zum Beispiel:

- . Feststellung der Follikelphase;
- . Kontrolle der Wirksamkeit der Ovulationsinduktion (mit Ultraschall) und des E2-Spiegels in der Follikelflüssigkeit. Dadurch ist es möglich eine normale oder gestörte Ovulationsinduktion festzustellen (das Empty Follicle Syndrome kann auf eine gestörte Ovulationsinduktion hinweisen);
- . Diagnostizierung des Luteinisierten unrupturierter Follikel (LUF)-Syndroms (durch die Messung der 17-beta-Östradiol- und Progesteronspiegel in der Peritonealflüssigkeit;
- . Unterstützung bei der Diagnose von Brusttumoren (die Aktivität des Gesamtöstrogens - E1-E2 - und der 17-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase ist in bösartigen Brustgeweben viel höher als in Gutartigen);
- . Bei LH-FSH- und E2-Werten ist der Verdacht auf ein Stein Cohen-Leventhal Syndrom gegeben;
- . Weitere Untersuchungsbereiche sind: prämatüre Adrenarche, Gynäkomastie und Menopause.

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

Eine festgesetzte Menge an ¹²⁵I markiertem E2 konkurriert mit dem zu messenden, in der Probe oder in dem Kalibrator vorhandenen E2 um eine Menge an Antikörperbindungsstellen, die an der Wand des Polystyren Röhrchens fixiert sind. Nach einer dreistündigen Inkubation bei 37°C, beendet das Absaugen die Verdrängungsreaktion. Die Röhrchen werden anschliessend mit Waschlösung gewaschen, danach wird nochmals abgesaugt. Eine Kalibrationskurve wird gedruckt und die E2-Konzentrationen der Proben werden über Dosis Interpolation der Kalibrationskurve bestimmt.

V. MITGELIEFERTER REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Rekonstitution			
 Mit anti E2- beschichtete Röhrchen	2 x 48	Gebrauchsfertig			
<table border="1" data-bbox="76 607 284 651"> <tr> <td>Ag</td> <td>¹²⁵I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes E2 (HPLC grade) in Äthanollösung	Ag	¹²⁵ I	CONC	1 Gefäß 1 ml 142 kBq	Übertragen Sie quantitativ die Äthanollösung in den Tracer-Puffer
Ag	¹²⁵ I	CONC			
<table border="1" data-bbox="76 730 284 775"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tracer-Puffer mit Rindergelatin und Azide (<0,1%)	TRACER	BUF	1 Gefäß 53 ml	Gebrauchsfertig	
TRACER	BUF				
<table border="1" data-bbox="113 842 247 887"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Null-Kalibrator in Humanserum und Azid (<0,5%)	CAL	0	1 Gefäß 0,5 ml	Gebrauchsfertig	
CAL	0				
<table border="1" data-bbox="113 943 247 987"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kalibratoren E2 : N = 1 bis 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Azid (<0,5%)	CAL	N	6 Gefäße 0,5 ml	Gebrauchsfertig	
CAL	N				
<table border="1" data-bbox="60 1088 304 1133"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" data-bbox="76 1189 284 1234"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Probenverdünner: Humanserum und Azid (<0,1%)	DIL	SPE	1 Gefäß 2,5 ml	Gebrauchsfertig	
DIL	SPE				
<table border="1" data-bbox="92 1290 268 1335"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanplasma und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	0,5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N				

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

Folgendes Material wird benötigt, aber nicht mit dem Kit mitgeliefert:

- Dest. Wasser
- Pipetten: 50 µl und 500 µl (Verwendung von Präzisionspipetten mit Einwegpipettenspitzen wird empfohlen)
- Vortexmischer
- Magnetrührer
- Wasserbad (37°C)
- 5 ml automatische Spritze (Cornwall-Typ) zum Waschen
- Absaugsystem (optional)
- Jeder Gamma-Counter, der ¹²⁵I messen kann, kann verwendet werden. Maximale Messeffizienz sollte gewährleistet sein.

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- Tracer:** Übertragen Sie quantitativ die Äthanollösung in den Tracer-Puffer und mischen Sie.
- Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0,5 ml dest. Wasser.
- Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.
- Nach der Rekonstitution sind die Kontrollen bei 2-8°C 7 Tage stabil. Aliquots müssen bei längerer Aufbewahrung bei -20°C eingefroren werden, dann sind sie 3 Monate haltbar. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Die Waschlösung sollte frisch hergestellt und am selben Tag aufgebraucht werden.
- Nach Verdünnung, der Tracer ist bei Lagerung in der gut verschlossenen Originalfläschchen bei 2 bis 8°C bis zum Verfallsdatum haltbar.
- Veränderungen im Aussehen der Kitkomponenten können auf Instabilität bzw. Zerfall hindeuten.

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Proben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.
- Verdünnung von hochkonzentrierten Proben: Der mitgelieferte Probenverdünner enthält eine geringe Menge Östradiol und muss getestet werden, um diese Konzentration zu ermitteln. Dieser Wert muss von der Konzentration der Proben subtrahiert werden, bevor die Ergebnisse mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden.

X. DURCHFÜHRUNG

A. Bemerkungen zur Durchführung

Verwenden Sie den Kit oder dessen Komponenten nicht nach dem Ablaufdatum. Vermischen Sie nie Materialien von unterschiedlichen Kit-Chargen. Bringen Sie alle Reagenzien vor der Verwendung auf Raumtemperatur. Mischen Sie alle Reagenzien und Proben gründlich durch sanftes Schütteln oder Rühren. Verwenden Sie saubere Einwegpipettenspitzen, um Kreuzkontamination zu vermeiden. Präzisionspipetten oder ein automatisches Pipettiersystem erhöhen die Präzision. Achten Sie auf die Einhaltung der Inkubationszeiten. Erstellen Sie für jeden Durchlauf eine Kalibrationskurve, verwenden Sie nicht die Daten von früheren Durchläufen.

B. Durchführung

- Beschriften Sie je 2 beschichtete Röhrchen für jeden Kalibrator, jede Kontrolle und jede Probe. Zur Bestimmung der Gesamtaktivität, beschriften Sie 2 normale Röhrchen.
- Vortexen Sie Kalibratoren, Kontrollen und Proben kurz und geben Sie 50 µl von jedem in ihre Röhrchen.
- Geben Sie 500 µl des ¹²⁵Iod markierten E2 in jedes Röhrchen, einschließlich der unbeschichteten Röhrchen für die Gesamtaktivität.
- Schütteln Sie vorsichtig die Halterung mit den Röhrchen um Blasen zu entfernen.
- Inkubieren Sie 3 Stunden bei 37°C im Wasserbad.
- Saugen Sie den Inhalt jedes Röhrchens ab (außer Gesamtaktivität). Vergewissern Sie sich, dass die Plastikspitze des Absaugers den Boden des beschichteten Röhrchens erreicht, um die gesamte Flüssigkeit zu entfernen.
- Waschen Sie die Röhrchen mit 3 ml Waschlösung (außer Gesamtaktivität) und saugen Sie ab. Vermeiden Sie Schaumbildung bei Zugabe der Waschlösung.
- Lassen Sie die Röhrchen 2 Minuten aufrecht stehen, und saugen Sie den verbleibenden Flüssigkeitstropfen ab.
- Werten Sie die Röhrchen in einem Gamma-Counter über 60 Sekunden aus.

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

- Berechnen Sie den Durchschnitt aus den Doppelbestimmungen.
- Berechnen Sie die gebundene Radioaktivität als Prozentsatz des am Null-Kalibratorpunkt (0) bestimmten Wertes nach folgender Formel:
- Verwenden Sie semi-logarithmisches oder doppelt-logarithmisches

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Aktivität (Kalibrator oder Probe)}}{\text{Aktivität (Null-Kalibrator)}} \times 100$$

Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der E2-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.

- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
- Bestimmen Sie die E2-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
- Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes E2 (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

Die folgenden Daten dienen nur zu Demonstrationszwecken und können nicht als Ersatz für die Echtzeitkalibrationekurve verwendet werden.

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität	69089	
Kalibrator		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

A. Nachweisgrenze

Zweiundzwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.

Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 2,7 pg/ml.

B. Spezifität

Der Prozentsatz der Kreuzreaktion, der im Vergleich der Konzentration geschätzt wurde, welche eine 50%ige Inhibition ergibt, beträgt respektive:

Substanz	Kreuz-Reaktivität (%)
Östron	1,0
Östriol	0,6
Ethinylöstradiol	0,2
Progesteron	<0,0002
Testosteron	<0,001
Androstendion	<0,001
DHEA-Sulphat	<0,0002
Östradiol-17-Glucuronide	<0,2
Cortisol	<0,001
Equilin	<0,1
Östradiol-17-Valerat	<0,1
Norgestrel	<0,0004
Androstendiol	0,001

C. Präzision

INTRA-ASSAY PRÄZISION

INTER-ASSAY PRÄZISION

Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Serum	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST

Verdünnung	Theoretische Konzent. (pg/ml)	Wiedergefunden (%)	Gemessene Konzent. (pg/ml)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

Die Probe wurde mit dem mitgelieferten Probenverdünner verdünnt. Die endogene Östradiolkonzentration im Probenverdünner betrug 13 pg/ml. Dieser Wert wurde vor Anwendung des Verdünnungsfaktors von der Probenkonzentration abgezogen.

Gemessene und theoretische Konzentrationen waren konsistent:

$$Y (\text{gemessene}) = 0,99X (\text{theoretische}) - 0; R^2 = 0,999$$

WIEDERFINDUNGSTEST

Probe	Zuggeg. E2 (pg/ml)	Theoretische E2 (pg/ml)	Wiedergef. E2 (pg/ml)	Wiedergefunden (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Gemessene und theoretische Konzentrationen waren konsistent:

$$- \text{Probe 1: } Y (\text{gemessene}) = 1,11X (\text{theoretische}) + 0; R^2 = 0,999$$

Umrechnungsfaktor:

$$\begin{aligned} \text{Von ng/ml in nmol/L:} & \quad \times 3,68 \\ \text{Von nmol/L in ng/ml:} & \quad \times 0,272 \end{aligned}$$

Die Konzentrationen der Kalibratoren werden mit der ID-GC/MS-Referenzmethode bestimmt.

E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe

Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 40 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

ZEITABSTAND

Serum (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

- Entsprechen die Ist-Werte nicht den auf den Fläschchen angegebenen Soll-Werten, können die Werte, ohne treffende Erklärung der Abweichungen, nicht weiterverarbeitet werden.
- Falls Extra-Kontrollen erwünscht sind, kann jedes Labor seinen eigenen Pool herstellen, der in Aliquots eingefroren werden sollte.
- Akzeptanzkriterien für die Differenz zwischen den Resultaten der Wiederholungstests anhand der Proben müssen auf Guter Laborpraxis beruhen.

V. ZU ERWARTENDER BEREICH

Diese Werte sind nur Richtwerte; jedes Labor muss seinen eigenen Normalwertbereich ermitteln.

	Konzentrationsbereich (2,5 bis 97,5% Perzentile) (pg/ml)	Median (pg/ml)	Anzahl von Personen
Gesunde Männer	8 - 66	27	36
Gesunde Frauen			
. Follikelphase (Tag -10 bis -3)	35-147	69	49
. Präovulationsphase (Tag -1 & 0)	70 - 490	135	13
. Lutealphase (Tag 3 bis 10)	43 - 217	105	35
. Postmenopausal	19 - 49	31	39

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit

Nur für diagnostische Zwecke.

Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.

Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.

Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die Laborausstattung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen gesondert werden, um Kreuzkontaminationen mit unterschiedlichen Radioisotopen zu verhindern.

Verschüttete radioaktive Substanzen müssen sofort den Sicherheitsbestimmungen entsprechend entfernt werden. Radioaktive Abfälle müssen entsprechend den lokalen Bestimmungen und Richtlinien der für das Labor zuständigen Behörden gelagert werden. Das Einhalten der Sicherheitsbestimmungen für den Umgang mit radioaktiven Substanzen gewährleistet ausreichenden Schutz.

Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.

Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.

Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.

Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

- ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
- GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

- HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
- METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
- PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
- SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
- WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

	GESAMT- AKTIVITÄT (μ l)	KALIBRA- TOREN (μ l)	PROBE(N)- KONTROLLEN (μ l)
Kalibratoren (0 to 6)	-	50	-
Proben, Kontrollen	-	-	50
Tracer	500	500	500
Inkubation	3 Std. bei 37°C im Wasserbad		
Separation	-		absaugen
Waschlösung	-		3,0 ml
Separation	-		absaugen
Auswertung	Messen der Röhren 60 Sekunden		



Prima di utilizzare il kit leggere attentamente le istruzioni per l'uso

E2-RIA-CT

I. USO DEL KIT

Kit radioimmunologico per la determinazione quantitativa in vitro dell'estradiolo umano (E2) in siero.

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

- A. Nome commerciale:** DIAsource E2-RIA-CT Kit
- B. Numero di catalogo:** KIP0629: 96 test
- C. Prodotto da:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgio.

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologica

Il 17 beta estradiolo (E2) è un ormone steroideo C-18 (peso molecolare di 272,4 Da) sintetizzato principalmente dall'ovaio e dalla placenta e in piccole quantità dalla corteccia surrenalica e dai testicoli. L'estradiolo è in equilibrio con l'estrone che può essere convertito in estradiolo dal fegato e dalla placenta.

B. Applicazioni cliniche

Come per il progesterone LH-FSH, la misurazione della concentrazione dell'estradiolo nel siero, nel fluido peritoneale e nel fluido follicolare rappresenta uno strumento biochimico fondamentale nell'analisi della fertilità, di neoplasie e patologie sessuali e a carico dell'asse ipotalamico/pituitario/gonadico, ad esempio:

- . Per rilevare la fase follicolare;
- . Per verificare l'efficacia dell'induzione dell'ovulazione (con gli ultrasuoni) e il livello di E2 nel fluido follicolare rende possibile il rilevamento dell'induzione dell'ovulazione normale o disfunzionale (la sindrome del follicolo vuoto può riflettere un'induzione dell'ovulazione disfunzionale),
- . Per diagnosticare la LUF syndrome (sindrome del follicolo luteinizzato e non rotto) (tramite valutazione dei livelli di 17 beta estradiolo e progesterone nel fluido peritoneale);
- . Per supportare la diagnosi di tumori al seno (estrogeni totali – attività E1-E2 - e 17 beta-idrossisteroide deidrogenasi sono significativamente più elevati nei tessuti mammari maligni piuttosto che in quelli non maligni);
- . Attraverso i livelli LH-FSH ed E2 è possibile sospettare una sindrome di Stein-Leventhal;
- . Altre aree di analisi sono: adrenarca prematuro, ginecomastia e menopausa.

IV. PRINCIPIO DEL METODO

Una quantità definita di E2 marcata con ^{125}I compete con il E2 presente in calibratore e campioni per un numero definito di siti di un anticorpo adsorbito sulla superficie interna di provette di polistirene. Dopo un'incubazione protrattasi per 3 ore a 37°C, la reazione di competizione viene interrotta per aspirazione della miscela di reazione. Le provette vengono quindi lavate con tampone di lavaggio diluito e aspirate. La concentrazione di E2 nei campioni viene calcolata per interpolazione sulla curva calibratore.

V. REATTIVI FORNITI

Reattivi	Kit da 96 test	Volume di ricostituzione			
Provette sensibilizzate con anticorpo anti E2	2 x 48	Pronte per l'uso			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Marcato: E2 marcato con ^{125}I (grado HPLC), in soluzione di etanolo</p>	Ag	^{125}I	CONC	1 flacone 1 ml 142 kBq	Trasferimento quantitativo della soluzione di etanolo nel tracer buffer
Ag	^{125}I	CONC			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Tracer Buffer con gelatina bovina e sodio azida (<0,1%)</p>	TRACER	BUF	1 flacone 53 ml	Pronte per l'uso	
TRACER	BUF				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Calibratore zero in siero umano e sodio azide (<0,5%)</p>	CAL	0	1 flacone 0,5 ml	Pronte per l'uso	
CAL	0				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Calibratore 1-6 di E2, (le concentrazioni esatte degli calibratore sono riportate sulle etichette dei flaconi), in siero umano e sodio azide (<0,5%)</p>	CAL	N	6 flaconi 0,5 ml	Pronte per l'uso	
CAL	N				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Tampone di lavaggio (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 flacone 10 ml	Diluire 70 x con acqua distillata usando un agitatore magnetico
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>Diluyente per i campioni: siero umano e azide (<0,1%)</p>	DIL	SPE	1 flacone 2,5 ml	Pronte per l'uso	
DIL	SPE				
<table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Controlli: N = 1 o 2, in plasma umano e timolo</p>	CONTROL	N	2 flaconi liofilizzati	Aggiungere 0.5 ml di acqua distillata	
CONTROL	N				

VI. REATTIVI NON FORNITI

Il seguente materiale è richiesto per il dosaggio ma non è fornito nel kit.

1. Acqua distillata.
2. Pipette per dispensare 50 µl e 500 µl (Si raccomanda di utilizzare pipette accurate con puntale in plastica monouso).
3. Agitatore tipo vortex.
4. Agitatore magnetico.
5. Bagno in acqua a 37°C
6. Pipetta a ripetizione automatica 5 ml per i lavaggi.
7. Sistema di aspirazione dei campioni (facoltativo).
8. Contatore gamma con finestra per ^{125}I (efficienza minima 70%)

VII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

- A. **Tracer** : Trasferimento quantitativo della soluzione di etanolo nel tracer buffer e mescolamento.
- B. **Controlli**: Ricostituire i controlli con 0.5 ml di acqua distillata.
- C. **Soluzione di lavoro del tampone di lavaggio**: Preparare la quantità necessaria di soluzione di lavoro del tampone di lavaggio aggiungendo 69 parti di acqua distillata ad una parte di tampone di lavaggio concentrato (70x). Usare un agitatore magnetico per rendere la soluzione omogenea. La soluzione di lavoro va scartata al termine della giornata.

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.
- Dopo reconstituzione, controlli sono stabili 1 settimana a 2-8°C e, suddivisi in aliquote a -20°C per 3 mesi. Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- La soluzione di lavoro del tampone di lavaggio deve essere preparata fresca ogni volta e usata nello stesso giorno della preparazione.
- Dopo la diluizione, il marcato è stabile fino alla data di scadenza riportata sull'etichetta, se conservato a 2-8°C nel flacone originale ben tappato.
- Alterazioni dell'aspetto fisico dei reattivi possono indicare una loro instabilità o deterioramento.

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.
- Diluizione di campioni a concentrazione elevata: il diluente fornito contiene una piccola quantità di estradiolo e deve essere analizzato per determinare la concentrazione di quest'ultimo. Il valore di concentrazione ottenuto deve essere sottratto dalla concentrazione dei campioni prima di moltiplicare i risultati per il fattore di diluizione.

X. METODO DEL DOSAGGIO

A. Avvertenze generali

Non usare il kit o suoi componenti oltre la data di scadenza. Non mescolare reattivi di lotti diversi. Prima dell'uso portare tutti i reattivi a temperatura ambiente. Mescolare delicatamente i campioni per inversione o rotazione. Per evitare cross-contaminazioni, cambiare il puntale della pipetta ogni volta che si usi un nuovo reattivo o campione. L'uso di pipette ben tarate e ripetibili o di sistemi di pipettamento automatici migliora la precisione del dosaggio. Rispettare i tempi di incubazione. Allestire una curva di taratura per ogni seduta analitica, in quanto non è possibile utilizzare per un dosaggio curve di taratura di sedute analitiche precedenti.

B. Metodo del dosaggio

1. Numerare le provette sensibilizzate necessarie per dosare in duplicato ogni calibratore, controllo o campione. Numerare 2 provette non sensibilizzate per la determinazione dell'attività totale.
2. Agitare brevemente su vortex calibratore, campioni e controlli. Dispensare 50 µl di calibratore, controlli e campioni nelle rispettive provette.
3. Dispensare 500 µl di E2 marcato con ^{125}I in tutte le provette, comprese quelle per l'attività totale.
4. Scuotere gentilmente il portaprovette per liberare eventuali bolle d'aria intrappolate nel liquido contenuto nelle provette.
5. Incubare 3 ore 37°C a bagnomaria.
6. Aspirare il liquido contenuto in tutte le provette, tranne in quelle per l'attività totale, facendo attenzione che il puntale dell'aspiratore raggiunga il fondo delle provette e che aspiri tutto il liquido.
7. Lavare tutte le provette, tranne quelle per l'attività totale, con 3 ml di soluzione di lavoro di tampone di lavaggio, evitando di provocare la formazione di schiuma.
8. Lasciare decantare le provette in posizione verticale per due minuti circa e aspirare eventuali gocce di liquido residue.
9. Contare tutte le provette per 1 minuto con il contatore gamma.

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

1. Calcolare la media delle determinazioni in duplicato.
2. Calcolare il rapporto (rapporto di competizione) tra radioattività legata alle provette di calibratore 1-5, campioni e controlli (B) e la radioattività legata alle provette dello calibratore zero (B0).

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{cpm (Calibratore, campioni o controlli)}}{\text{cpm (Zero Calibratore)}} \times 100$$

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di E2, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un

sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.

5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di E2.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

I sotto riportati sono forniti a titolo di esempio e non devono essere utilizzati per calcolare le concentrazioni di E2 in campioni e controlli al posto della curva calibratore eseguita contemporaneamente.

E2-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		69089	
Calibratore	0 pg/ml	29372	100,0
	9 pg/ml	25237	85,9
	27 pg/ml	21374	72,7
	92 pg/ml	15669	53,4
	430 pg/ml	8527	29,0
	2200 pg/ml	2607	8,9
	3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti due a zero calibratori sono stati analizzati insieme a una serie di altri calibratori.

La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 2,7 pg/ml.

B. Specificità

Le percentuali di cross-reattività stimata rispetto alla concentrazione in grado di produrre un'inibizione al 50% sono rispettivamente:

Composto	Cross-Reattività (%)
Estrone	1,0
Estriolo	0,6
Etinilestradiolo	0,2
Progesterone	<0,0002
Testosterone	<0,001
Androstenedione	<0,001
DHEA solfato	<0,0002
Estradiol-17-glucuronide	<0,2
Cortisolo	<0,001
Equilino	<0,1
Estradiol 17 Valerato	<0,1
Norgestrel	<0,0004
Androstenedione	0,001

C. Precisione

INTRA SAGGIO

INTER SAGGIO

Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Siero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)	Recupero (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

Il campione è stato diluito con il diluente fornito. L'estradiolo endogeno nel diluente era 13 pg/ml e questo valore è stato dedotto dalla concentrazione del campione prima di applicare il fattore di diluizione.

Concentrazioni misurate e teoriche sono stati coerenti:

$$Y \text{ (misurata)} = 0,99 X \text{ (teorica)} - 0; R^2 = 0,999$$

TEST DI RECUPERO

Campione	E2 aggiunto (pg/ml)	E2 teorica (pg/ml)	E2 misurata (pg/ml)	Recupero (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Concentrazioni misurate e teoriche sono stati coerenti:

$$\text{- Campione 1: } Y \text{ (misurata)} = 1,11 X \text{ (teorica)} + 0; R^2 = 0,999$$

Fattore di conversione:

$$\begin{aligned} \text{Da ng/ml a nmol/l:} & \quad \times 3,68 \\ \text{Da nmol/l a ng/ml:} & \quad \times 0,272 \end{aligned}$$

Le concentrazioni dei calibratori sono definite con il metodo di riferimento ID-GC/MS.

E. Tempo trascorso tra l'aggiunta dell'ultimo calibratore e il campione

Come mostrato nella seguente tabella, il dosaggio si mantiene accurato anche quando un campione viene aggiunto nelle provette sensibilizzate 40 minuti dopo l'aggiunta del calibratore.

TEMPO TRASCORSO

Siero (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

- Se i risultati ottenuti dosando il Controllo 1 e il Controllo 2 non sono all'interno dei limiti riportati sull'etichetta dei flaconi, non è opportuno utilizzare i risultati ottenuti per i campioni, a meno che non si trovi una giustificazione soddisfacente.
- Ogni laboratorio può preparare un proprio pool di sieri da utilizzare come controllo, da conservare congelato in aliquote.
- I criteri di accettazione delle differenze tra i risultati in duplicato dei campioni devono basarsi sulla buona prassi di laboratorio.

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

Questi valori sono puramente indicativi, ciascun laboratorio potrà stabilire i propri intervalli normali.

	Intervallo di concentrazione (2,5 - 97,5% percentili) (pg/ml)	Mediana (pg/ml)	Numero di soggetti
Maschi normali	8 - 66	27	36
Femmine normali			
. Fase follicolare (giorno da -10 a -3)	35-147	69	49
. Fase preovulatoria (giorno -1 & 0)	70 - 490	135	13
. Fase luteale (giorno da 3 a 10)	43 - 217	105	35
. Postmenopausa	19 - 49	31	39

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza

Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.

Il kit contiene ^{125}I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.

L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni. In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni. Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil.andSteril.46,5,823-827
4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

	Attività totale μl	Calibratore μl	Campioni Controlli μl
Calibratore (0 - 6)	-	50	-
Campioni, controlli diluiti	-	-	50
Marcato	500	500	500
Incubazione	3 ore a 37°C a bagnomaria		
Separazione Soluzione di lavoro del tampono di lavaggio		Aspirare 3 ml	
Separazione		Aspirare	
Conteggio	Contare le provette per 1 minuto		

Leer el protocolo completo antes de usar.

E2-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa in vitro de Estradiol humano (E2) en suero.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. Nombre:** DIAsource E2-RIA-CT Kit
- B. Número de Catálogo:** KIP0629 : 96 tests
- C. Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Para cuestiones técnicas y información sobre pedidos contactar :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

- A. Actividad biológica**
17-beta-estradiol (E2) es una hormona esteroide C-18 (peso molecular 272.4 Da) producida principalmente por los ovarios y la placenta y en pequeñas cantidades por las suprarrenales y los testículos. El estradiol está en equilibrio con la estrona, que puede convertirse en estriol en el hígado y la placenta.
- B. Aplicaciones clínicas**
Tal como para HL-FSH-progesterona, la medición de la concentración de estradiol sérico, en líquido peritoneal y líquido folicular es una herramienta bioquímica esencial para la investigación de la fertilidad, enfermedades por tumores, enfermedades sexuales y desórdenes hipotalámico/pituitaria/eje gonadales, por ejemplo:
- . Para detectar la fase folicular;
 - . Para comprobar cuán efectiva es la inducción de la ovulación (con ultrasonido) y el nivel de E2 en líquido folicular hace posible detectar inducción de ovulación normal o disfuncional. (El síndrome de folículo vacío puede reflejar una inducción disfuncional de la ovulación);
Para diagnosticar síndrome de folículo luteinizado sin ruptura (LUF) (estimando los niveles de 17 -estradiol y progesterona en el líquido peritoneal);
 - . Para asistir al diagnóstico de tumores de mama (estrógenos totales - E1-E2 - y actividad de 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa están significativamente aumentados en tejido mamario maligno en comparación con el no maligno);
 - . Con niveles HL-HEF y E2, es posible sospechar la presencia de un síndrome de Stein Cohen-Leventhal;
 - . Otras áreas de investigación son: adrenaquia prematura, ginecomastia y periodo menopáusico.

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de esteroide marcada con I^{125} compete con el esteroide a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se necesita ni extracción ni cromatografía debido a la alta especificidad de los anticuerpos que recubren Después de 3 horas de incubación a 37°C en baño de agua, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 3 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de E2 de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Kit 96 test	Reconstitución			
Tubos recubiertos con anti E2	2 x 48	Listo para uso			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>I^{125}</td> <td>CONC</td> </tr> </table> TRAZADOR: E2 marcado con I^{125} (grado HPLC) en solución de etanol	Ag	I^{125}	CONC	1 vial 1 ml 142 kBq	Transfiera <i>cuantitativamente</i> la solución de etanol al tampón trazador
Ag	I^{125}	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> Tampón trazador con gelatina bovina y azida (<0.1%)	TRACER	BUF	1 vial 53 ml	Listo para uso	
TRACER	BUF				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> Calibrador cero en suero humano y azida (<0.5%)	CAL	0	1 vial 0,5 ml	Listo para uso	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> Calibradores E2 - N = 1 al 6 (mirar los valores exactos en las etiquetas) en suero humano y azida (<0.5%)	CAL	N	6 viales 0,5 ml	Listo para uso	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> Solución de lavado (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 vial 10 ml	Diluir 70 x con agua destilada (utilizar agitador magnético)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> Diluyente de muestras: Suero humano y azida (<0,1%)	DIL	SPE	1 vial 2,5 ml	Listo para uso	
DIL	SPE				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> Controles - N = 1 ó 2 en plasma humano y thymol	CONTROL	N	2 viales líoofilizados	Añadir 0.5 ml de agua destilada	
CONTROL	N				

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

El material mencionado a continuación es necesario y no está incluido en el kit

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl y 500µl (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Baño de agua a 37°C
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I^{125} (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

- A. **Trazador** : Transfiera cuantitativamente la solución de etanol al tampón trazador y mezcle.
- B. **Controles**: Reconstituir los controles con 0.5 ml de agua destilada.
- C. **Solución de lavado de trabajo**: Preparar el volumen necesario de Solución de lavado de trabajo mezclando 69 partes de agua destilada por 1 parte de Solución de lavado (70x). Utilizar un agitador magnético para homogeneizar. Desechar la solución de lavado de trabajo no utilizada al final del día.

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

- Antes de abrir ó reconstituir todos los componentes de los kits son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta, si se guardan a 2-8°C.
- Después de su reconstitución los controles son estables durante una semana a 2-8°C. Para periodos más largos, alicuotar y guardar a -20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- La solución de lavado de trabajo recién preparada solo debe utilizarse en el mismo día
- después de la dilución, el trazador es estable hasta la fecha de caducidad, si se guarda en el vial original cerrado a 2-8°C.
- Las alteraciones de los reactivos en el aspecto físico pueden indicar inestabilidad ó deterioro.

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a -20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.
- Dilución de muestras de alta concentración: El diluyente suministrado contiene una pequeña cantidad de estradiol y debe analizarse para determinar esta concentración. Este valor tiene que restarse de la concentración de las muestras antes de multiplicar los resultados por el factor de dilución.

X. PROTOCOLO

A. Notas de manejo

No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.

El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.

Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

B. Protocolo

1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
3. Dispensar 500 µl de E2 marcado con I^{125} en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva en las paredes de los tubos.
5. Incubar durante 3 horas a 37°C en baño de agua.
6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
7. Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

1. Calcular la media de los duplicados.
2. Calcular la radiactividad enlazada como un porcentaje de la unión con respecto al calibrador cero (0) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Cuentas (Calibrado r ó muestra)}}{\text{Cuentas (Calibrador Cero)}} \times 100$$

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las concentraciones del E2 de cada calibrador, rechazando los extremos claros.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica " 4 parámetros".

- Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
- El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de E2 no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

Los datos mostrados a continuación sirven como ejemplo y nunca deberán ser usados como una calibración real.

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales	69089	
Calibrador		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte dos calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 2,7 pg/ml.

B. Especificidad

El porcentaje de reacción cruzada estimada en relación a la concentración que produce 50% de inhibición es respectivamente:

Componente	Reacción-cruzada (%)
Estrona	1,0
Estríol	0,6
Etinilestradiol	0,2
Progesterona	<0,0002
Testosterona	<0,001
Androstenediona	<0,001
DHEA-sulfato	<0,0002
Estradiol-17-glucuronida	<0,2
Cortisol	<0,001
Equilín	<0,1
Estradiol-17-Valerate	<0,1
Norgestrel	<0,0004
Androstendiol	0,001

C. Precisión

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Suero	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN

Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)	Recuperado (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

La muestra se diluyó con el diluyente suministrado. La concentración de estradiol endógeno en el diluyente fue de 13 pg/ml; este valor se restó de la concentración de la muestra antes de aplicar el factor de dilución.

Concentraciones medidas y teóricas fueron consistentes:

$$Y (\text{medidas}) = 0,99X (\text{teóricos}) - 0 ; R^2 = 0,999$$

TEST DE RECUPERACIÓN

Muestra	E2 añadido (pg/ml)	E2 Teórica (pg/ml)	E2 Medida (pg/ml)	Recuperado (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Concentraciones medidas y teóricas fueron consistentes:

$$\text{Muestra 1: } Y (\text{medidas}) = 1,11X (\text{teóricos}) + 0 ; R^2 = 0,999$$

Factor de conversión:

$$\begin{aligned} \text{De ng/ml a nmol/L :} & \quad \times 3,68 \\ \text{De nmol/L a ng/ml :} & \quad \times 0,272 \end{aligned}$$

Las concentraciones de los calibradores se determinan con el método de referencia ID-GC/MS.

E. Tiempo de espera entre la dispensación del último calibrador y la de la muestra

Como se muestra a continuación la precisión del ensayo se mantiene incluso en el caso de dispensar la muestra 40 minutos después de haberse adicionado el calibrador a los tubos cubiertos.

TIEMPO DE ESPERA

Suero (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

- Si los resultados obtenidos para el Control 1 y/o Control 2 no están dentro del rango especificado en la etiqueta del vial, los resultados obtenidos no podrán ser utilizados a no ser que se pueda dar una explicación convincente de dicha discrepancia
- Si es conveniente, - cada laboratorio puede utilizar sus propios pools de controles, lo cuales se guardan en alícuotas congeladas.
- Los criterios de aceptación de la diferencia entre los resultados in duplo de las muestras se apoyan en las prácticas de laboratorio corrientes.

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

Estos valores solamente sirven de pauta; cada laboratorio tiene que establecer sus propios valores normales.

	Rango de concentración (2.5 a 97.5% percentiles) (pg/ml)	Concentración promedio (pg/ml)	Número de sujetos
Hombres Normales	8 - 66	27	36
Mujeres Normales			
. Fase folicular (día -10 a 3)	35-147	69	49
. Fase pre ovulatoria (día -1 & 0)	70 - 490	135	13
. Fase lútea (día 3 a 10)	43 - 217	105	35
. Post menopáusica	19 - 49	31	39

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad

Para uso solo en diagnóstico in vitro.

Este kit contiene ^{125}I (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.

Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.

Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.

Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.

Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/ó la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.

Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.

Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.

No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
- GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
- HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

- METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17- β -hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
- PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
- SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
- WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

	CUENTAS TOTALES (μl)	CALIBRADORES (μl)	MUESTRA(S) CONTROL(S) (μl)
Calibradores (0 al 6)	-	50	-
Muestras, controles	-	-	50
Trazador	500	500	500
Incubación	3 horas a 37°C en baño de agua		
Separación	-	aspirar 3,0 ml	
Solución de lavado de trabajo		aspirar cuidadosamente	
Separación			
Contaje	Contar los tubos durante 60 segundos		

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

E2-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για την in vitro ποσοτική μέτρηση της ανθρώπινης οιστραδιόλης (E2) σε ορό.

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

- A. Εμπορική ονομασία:** Κιτ E2-RIA-CT της DIAsource
- B. Αριθμός καταλόγου:** KIP0629: 96 προσδιορισμοί
- Γ. Κατασκευάζεται από την:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

Για τεχνική βοήθεια ή πληροφορίες σχετικά με παραγγελίες επικοινωνήστε στα:
Τηλ.: +32 (0)10 84.99.11 Φαξ: +32 (0)10 84.99.91

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

- A. Βιολογική δράση**
Η 17-β-οιστραδιόλη (E2) είναι μια C-18 στεροειδής ορμόνη (μοριακό βάρος 272.4 Da), η οποία παράγεται κυρίως από τις ωθήκες και τον πλακούντα και σε μικρές ποσότητες από τα επινεφρίδια και τους όρχεις. Η οιστραδιόλη είναι σε ισορροπία με την οιστρόνη, η οποία μπορεί να μετατραπεί σε οιστριόλη από το ήπαρ και τον πλακούντα.
- B. Κλινικές εφαρμογές**
Όπως ισχύει και για την LH-FSH-προγεστερόνη, η μέτρηση της συγκέντρωσης της οιστραδιόλης στον ορό, το περιτοναϊκό υγρό και το ωοθυλακικό υγρό αποτελεί ένα σημαντικό βιοχημικό εργαλείο για τη διερεύνηση της γονιμότητας, όγκων και σεξουαλικών νόσων και διαταραχών του άξονα υποθάλαμος/υπόφυση/γονάδες, για παράδειγμα:
- Για ανίχνευση της φάσης ωοθυλακιορρηξίας.
 - Για έλεγχο της αποτελεσματικότητας της επαγωγής της ωορρηξίας (με υπέρηχο) και το επίπεδο της E2 στο ωοθυλακικό υγρό κάνει δυνατή την ανίχνευση της φυσιολογικής ή δυσλειτουργικής επαγωγής ωορρηξίας (το σύνδρομο του κενού ωοθυλακίου μπορεί να υποδηλώνει δυσλειτουργική επαγωγή ωορρηξίας).
 - Για διάγνωση του συνδρόμου του ωχρινοποιημένου άνευ ρήξεως ωοθυλακίου (LUF) (με τον υπολογισμό των επιπέδων της 17 β-οιστραδιόλης και της προγεστερόνης στο περιτοναϊκό υγρό).
 - Ως βοήθημα στη διάγνωση όγκων του μαστού (τα ολικά οιστρογόνα - E1-E2 - και η δραστηριότητα της 17 β-υδροξυεστεροειδούς δεϋδρογονάσης είναι κατά πολύ υψηλότερα σε ιστούς του μαστού με κακοήθεια από ότι σε ιστούς χωρίς κακοήθεια).
 - Με τα επίπεδα των LH-FSH και E2, είναι δυνατόν να υποψιαστεί κανείς το σύνδρομο Stein Cohen-Leventhal.
 - Άλλα πεδία διερεύνησης είναι: πρόωγη αδρεναρχή, γυναικομαστία και περίοδος εμμηνόπαυσης.

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Μια σταθερή ποσότητα στεροειδούς σημασμένου με ^{125}I ανταγωνίζεται με το στεροειδές που θα μετρηθεί, το οποίο υπάρχει στο δείγμα ή στο βαθμονομητή, για σταθερή ποσότητα θέσεων αντισωμάτων που είναι ακινητοποιημένα στο τοίχωμα ενός σωληναρίου πολυστυρενίου. Δεν απαιτείται εκχύλιση ή χρωματογραφία λόγω της υψηλής ειδικότητας των επιστρωμένων αντισωμάτων. Μετά από επώαση διάρκειας 3 ωρών στους 37°C , η αντίδραση ανταγωνισμού τερματίζεται με ένα βήμα αναρρόφησης. Τα σωληνάρια κατόπιν πλένονται με 3 ml διαλύματος πλύσης και αναρροφούνται. Παριστάνεται γραφικά μια καμπύλη βαθμονόμησης και προσδιορίζονται οι συγκεντρώσεις της E2 των δειγμάτων με αναγωγή συγκεντρώσεων από την καμπύλη βαθμονόμησης.

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προσδιορισμών	Ανασύσταση			
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι E2	2 x 48	Έτοιμο για χρήση			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: E2 σημασμένη με ^{125}I ιωδίνη (τύπου HPLC) σε διάλυμα αιθανόλης</p>	Ag	^{125}I	CONC	1 φιαλίδιο 1 ml 142 kBq	Ποσοτική μεταφορά του διαλύματος αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα του ιχνηθέτη
Ag	^{125}I	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Ρυθμιστικό διάλυμα ιχνηθέτη με βόεια ζελατίνη και αζίδιο (<0,1%)</p>	TRACER	BUF	1 φιαλίδιο 53 ml	Έτοιμο για χρήση	
TRACER	BUF				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (<0,5%)</p>	CAL	0	1 φιαλίδιο 0,5 ml	Έτοιμο για χρήση	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Βαθμονομητές E2 N = 1 έως 6 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (<0,5%)</p>	CAL	N	6 φιαλίδια 0,5 ml	Έτοιμο για χρήση	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 φιαλίδιο 10 ml	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>Αραιωτικό δειγμάτων: ορός ανθρώπου και αζίδιο (<0,1%)</p>	DIL	SPE	1 φιαλίδιο 2,5 ml	Έτοιμο για χρήση	
DIL	SPE				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο πλάσμα και θυμόλη</p>	CONTROL	N	2 φιαλίδια λυοφιλοποιημένο	Προσθέστε 0.5 ml απεσταγμένου νερού	
CONTROL	N				

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

1. Απεσταγμένο νερό
2. Πιπέτες για διανομή: 50 μl και 500 μl (συνιστάται η χρήση πιπετών ακριβείας με αναλώσιμα πλαστικά ρύγχη)
3. Αναμεικτής στροβιλισμού
4. Μαγνητικός αναδευτήρας
5. Υδατόλουτρο στους 37°C
6. Αυτόματη σύριγγα των 5 ml (τύπου Cornwall) για πλύση
7. Σύστημα αναρρόφησης (προαιρετικό)
8. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε μετρητής γ ακτινοβολίας με δυνατότητα μέτρησης της ^{125}I (ελάχιστη απόδοση 70%).

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

- A. Ιχνηθέτης: **Μεταφέρετε ποσοτικά** το διάλυμα αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα του ιχνηθέτη και αναμειξτε.
- B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0.5 ml απεσταγμένου νερού.

- G. **Διάλυμα πλύσης εργασίας:** Προετοιμάστε επαρκή όγκο διαλύματος πλύσης εργασίας με προσθήκη 69 όγκων απεσταγμένου νερού σε 1 όγκο διαλύματος πλύσης (70x). Χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα για την ομογενοποίηση. Απορρίψτε το μη χρησιμοποιημένο διάλυμα πλύσης εργασίας στο τέλος της ημέρας.

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

- Πριν από το άνοιγμα ή την ανασύσταση, όλα τα συστατικά του κιτ παραμένουν σταθερά έως την ημερομηνία λήξης, η οποία αναγράφεται στην ετικέτα, εφόσον διατηρούνται σε θερμοκρασία 2 έως 8°C .
- Μετά την ανασύσταση, οι οροί ελέγχου παραμένουν σταθεροί για μία εβδομάδα σε θερμοκρασία 2 έως 8°C . Για μεγαλύτερες περιόδους φύλαξης, πρέπει να σχηματίζονται κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης και να διατηρούνται στους -20°C για 3 μήνες το μέγιστο. Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Φρέσκο, παρασκευασμένο διάλυμα πλύσης εργασίας θα πρέπει να χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα.
- Μετά την αραίωση, ο ιχνηθέτης παραμένει σταθερός έως την ημερομηνία λήξης, εφόσον διατηρείται στο αρχικό, ερμητικά κλειστό φιαλίδιο σε θερμοκρασία 2 έως 8°C .
- Τυχόν μεταβολές της φυσικής εμφάνισης των αντιδραστηρίων του κιτ ενδέχεται να υποδηλώνουν αστάθεια ή αλλοίωση.

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2- 8°C .
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20°C .
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.
- Αραιώστε δείγματα υψηλής συγκέντρωσης: το παρεχόμενο αραιωτικό περιέχει μικρή ποσότητα ιοστραδιόλης και πρέπει να εξετάζεται για να προσδιοριστεί αυτή η συγκέντρωση. Αυτή η τιμή πρέπει να αφαιρεθεί από τη συγκέντρωση των δειγμάτων πριν από τον πολλαπλασιασμό των αποτελεσμάτων με τον συντελεστή αραίωσης.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

A. Σημειώσεις σχετικά με το χειρισμό

Μη χρησιμοποιείτε το κιτ ή τα συστατικά μετά την ημερομηνία λήξης. Μην αναμειγνύετε υλικά από διαφορετικές παρτίδες κιτ. Φέρετε όλα τα αντιδραστήρια σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Αναμειξτε καλά όλα τα αντιδραστήρια και τα δείγματα με απαλή ανακίνηση ή ανάδευση. Χρησιμοποιείτε ένα καθαρό αναλώσιμο ρύγχος πιπέτας για την προσθήκη κάθε διαφορετικού αντιδραστηρίου και δείγματος προκειμένου να αποφύγετε την επιμόλυνση. Η ακρίβεια βελτιώνεται με χρήση πιπετών υψηλής ακρίβειας ή αυτοματοποιημένου εξοπλισμού διανομής με πιπέτες. Τηρείτε τους χρόνους επώασης. Προετοιμάστε μια καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε ανάλυση και μη χρησιμοποιείτε δεδομένα από προηγούμενες αναλύσεις.

B. Διαδικασία

1. Σημάνετε επιστρωμένα σωληνάρια εις διπλούν για κάθε βαθμονομητή, ορό ελέγχου και δείγμα. Για τον προσδιορισμό των μετρήσεων του ιχνηθέτη ^{125}I ("total"), σημάνετε 2 κοινά (μη επιστρωμένα) σωληνάρια.
2. Αναμειξτε για λίγο (με αναμεικτή στροβιλισμού τύπου vortex) βαθμονομητές, ορούς ελέγχου και δείγματα και διανείμετε 50 μl από έκαστο σε αντίστοιχα σωληνάρια.
3. Διανείμετε 500 μl E2 σημασμένης με ^{125}I σε κάθε σωληνάριο, συμπεριλαμβανοντας τα μη επιστρωμένα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ("total").
4. Ανακινήστε απαλά με το χέρι τη βάση στήριξης των σωληναρίων για να απελευθερώσετε τυχόν παγιδευμένες φυσαλίδες αέρα.
5. Επώαστε για 3 ώρες στους 37°C σε λουτρό νερού.
6. Αναρροφήστε (ή μεταγγίστε) το περιεχόμενο κάθε σωληναρίου (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]). Βεβαιωθείτε ότι το πλαστικό ρύγχος του αναρροφητή φθάνει στον πυθμένα του επιστρωμένου σωληναρίου προκειμένου να αφαιρεθεί όλη η ποσότητα του υγρού.
7. Πλύνετε τα σωληνάρια με 3 ml διαλύματος πλύσης εργασίας (με εξαίρεση εκείνα που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ^{125}I ["total"]) και αναρροφήστε (ή μεταγγίστε). Αποφύγετε το σχηματισμό αφρού κατά τη διάρκεια της προσθήκης του διαλύματος πλύσης εργασίας.
8. Αφήστε τα σωληνάρια να σταθούν σε όρθια θέση για δύο λεπτά και αναρροφήστε τη σταγόνα υγρού που απομένει.
9. Μετρήστε τα σωληνάρια σε μετρητή γ ακτινοβολίας για 60 δευτερόλεπτα.

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (BΒαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις (ΜΜηδενικάβαθμονομητής)}} \times 100$$

- Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B₀(%)) για κάθε σημείο βαθμονομητή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της E2 για κάθε σημείο βαθμονομητή. Απορρίψτε τις εμφανείς μη αποδεκτές τιμές.
- Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν επίσης μέθοδοι με τη βοήθεια ηλεκτρονικού υπολογιστή. Εάν χρησιμοποιείται αυτόματη επεξεργασία αποτελεσμάτων, συνιστάται προσαρμογή καμπύλης λογιστικής συνάρτησης 4 παραμέτρων.
- Με αναγωγή των τιμών των δειγμάτων (B/B₀ (%)), προσδιορίστε τις συγκεντρώσεις E2 των δειγμάτων από την καμπύλη βαθμονόμησης.
- Για κάθε προσδιορισμό, πρέπει να ελέγχεται το ποσοστό του συνολικού ιχνηθέτη που δεσμεύεται εν τη απουσία μη σημασμένης E2 (B₀/T).

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

Τα ακόλουθα δεδομένα προορίζονται μόνο ως παράδειγμα και δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ποτέ αντί της καμπύλης βαθμονόμησης πραγματικού χρόνου.

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")	69089	
Βαθμονομητής		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

A. Όριο ανίχνευσης

Μετρήθηκαν Είκοσι δύο βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών.

Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 2,7 pg/ml.

B. Ειδικότητα

Το ποσοστό διασταυρούμενης αντίδρασης, που υπολογίζεται με σύγκριση της συγκέντρωσης που αποδίδει αναστολή 50%, είναι αντίστοιχα:

Ένωσις	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Οιστρόνη	1,0
Οιστριόλη	0,6
Αιθυνυλοιστραδιόλη	0,2
Προγεστερόνη	<0,0002
Τεστοστερόνη	<0,001
Ανδροστενεδιόνη	<0,001
DHEA-θεικό	<0,0002
17-γλυκουρονιδική οιστραδιόλη	<0,2
Κορτιζόλη	<0,001
Equilin	<0,1
17-βαλεριανική οιστραδιόλη	<0,1
Νοργεστρέλη	<0,0004
Ανδροστενεδιόλη	0,001

Γ. Ακρίβεια

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΙΔΙΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ

ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΜΕΤΑΞΥ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΩΝ

Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)	Ορός	N	<X> ± T.A. (pg/ml)	Σ.Δ. (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

T.A.: Τυπική απόκλιση, Σ.Δ.: Συντελεστής διακύμανσης

Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ

Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρούμενη συγκέντρωση (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

Το δείγμα αραιώθηκε με το παρεχόμενο αραιωτικό. Η ενδογενής οιστραδιόλη στο αραιωτικό ήταν 13 pg/ml και αυτή η τιμή αφαιρέθηκε από τη συγκέντρωση του δείγματος πριν από την εφαρμογή του συντελεστή αραιώσης.

Μετρημένη και θεωρητικές συγκεντρώσεις ήταν συνεπείς:

Y (μετρούμενη) = 0,99X (θεωρητική) - 0 ; R² = 0,999

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ

Δείγμα	Προσθεθείσα E2 (pg/ml)	Θεωρητική E2 (pg/ml)	Μετρούμενη E2 (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Μετρημένη και θεωρητικές συγκεντρώσεις ήταν συνεπείς:

- Δείγμα 1: Y (μετρούμενη) = 1,11X (θεωρητική) + 0 ; R² = 0,999

Συντελεστής μετατροπής:

Από ng/ml σε nmol/l: x 3,68

Από nmol/l σε ng/ml: x 0,272

Οι συγκεντρώσεις των βαθμονομητών προσδιορίζονται με τη μέθοδο αναφοράς ID-GC/MS.

E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

Όπως φαίνεται στη συνέχεια, τα αποτελέσματα του προσδιορισμού παραμένουν αξιόπιστα ακόμα και όταν διανέμεται ένα δείγμα 40 λεπτά μετά την προσθήκη του βαθμονομητή στα επιστρωμένα σωληνάρια.

ΜΕΣΟΔΙΑΣΤΗΜΑ

Ορός (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να

χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.

- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

TIMES ANAΦΟΡΑΣ

Οι τιμές αυτές παρέχονται μόνον ως οδηγός. Κάθε εργαστήριο θα πρέπει να καθιερώσει το δικό του πεδίο φυσιολογικών τιμών.

	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (ποσοστά επί τοις εκατό 2,5 έως 97,5%) (pg/ml)	Διάμεσος (pg/ml)	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικοί άνδρες	8 - 66	27	36
Φυσιολογικές γυναίκες			
· Ωοθυλακική φάση (ημέρα -10 έως -3)	35-147	69	49
· Προωορρηξιακή Φάση (ημέρα -1 & 0)	70 - 490	135	13
· Ωχρινική φάση (ημέρα 3 έως 10)	43 - 217	105	35
· Μετεμηνόπαυσιακές	19 - 49	31	39

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλεια

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.

Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35.5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.

Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.

Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.

Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.

Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικώς μολυσματικά.

Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μόλυβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.

Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil. and Steril., 48, 1, 94-97.
2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17βOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

	ΟΑΙΚΕΣ ΚΡΟΥΣΕΙΣ μl	ΒΑΘΜΟΝΟ ΜΗΤΕΣ μl	ΔΕΙΓΜΑ(ΤΑ) ΟΡΟΙ ΕΛΕΓΧΟΥ μl
Βαθμονομητές (0-6) Δείγματα, οροί ελέγχου Ιχνηθέτης	- - 500	50 - 500	- 50 500
Επώαση	3 ώρες στους 37° C σε λουτρό νερού		
Διαχωρισμός Διάλυμα πλύσης εργασίας Διαχωρισμός	-	αναρρόφηση 3,0 ml προσεκτική αναρρόφηση	
Μέτρηση	Μέτρηση σωληναρίων επί 60 δευτερόλεπτα		

CE

pl

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

E2-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru in vitro ludzkiego Estradiol (E2) w ludzkiej surowicy.

II. INFORMACJE OGÓLNE

- A. Nazwa firmowa:** DIASource E2-RIA-CT
- B. Numer katalogowy:** KIP0629 : 96 oznaczeń
- C. Wyprodukowano przez:** DIASource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgia.

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

17-beta-estradiol (E2) jest 18-węglowym hormonem sterydowym (masa cząsteczkowa 272,4 Da) wytwarzanym głównie przez jajnik i łożysko, oraz w niewielkich ilościach w nadnerczach i jądrach. Estradiol znajduje się w równowadze z estronem, który może być przekształcany do estriolu w wątrobie i łożysku.

B. Zastosowania kliniczne

Podobnie jak LH, FSH i progesteron, pomiar stężenia estradiolu w surowicy, płynie otrzewnowym i płynie owodniowym jest podstawowym narzędziem biochemicznym w diagnostyce niepłodności, chorób nowotworowych i seksualnych i zaburzeń osi podwzgórzowo-przysadkowo-gonadalnej, na przykład:

- Wykrywanie fazy folikularnej;
- Kontrola skuteczności indukcji owulacji (za pomocą badania ultradźwiękowego) oraz poziomu E2 w płynie owodniowym, co pozwala na wykrywanie prawidłowej lub nieprawidłowej indukcji owulacji (zespół pustego pęcherzyka może odzwierciedlać indukcję nieprawidłowej owulacji);
- Rozpoznawanie zespołu luteinowanego, niepękniętego pęcherzyka (luteinized unruptured follicle (LUF)) (poprzez ocenę poziomów 17-beta-estradiolu i progesteronu w płynie otrzewnowym);
- Pomoc w rozpoznawaniu guzów sutka (poziomy estrogenów całkowitych - E1-E2 - oraz aktywność dehydrogenazy 17-beta-hydroksysterydowej są znacząco wyższe w złośliwych niż niezłośliwych tkankach sutka);
- Wraz z poziomami LH-FSH i E2, istnieje możliwość ułatwienia rozpoznania zespołu Stein'a-Cohen'a-Leventhal'a;
- Innymi obszarami, których dotyczy pomiar estradiolu są: przedwczesne dojrzewanie płciowe, ginekomastia i okres menopauzalny.

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

W celu pomiaru substancji obecnej w próbce lub w kalibratorze, odpowiednią ilość cząsteczek steryd oznakowanych ^{125}I współzawodniczy z steryd o określonej ilości miejsc na przeciwciałach unieruchomionych na ściance próbówki polistyrenowej. Ze względu na wysoką swoistość opłaszczonych przeciwciał nie jest wymagane zastosowanie ani ekstrakcji, ani chromatografii. Po trzygodzinnej inkubacji w temperaturze 37°C , wykonanie aspiracji przerywa reakcję kompetycyjną. Następnie próbówki są płukane przy pomocy 3 ml roztworu płuczącego i aspirowane. Wykreślana jest krzywa kalibracyjna a stężenia E2 w próbkach są określane na podstawie nałożenia dawki na krzywą kalibracyjną.

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Rekonstrukcja			
Próbówki opłaszczone anty-E2	2 x 48	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>ZNACZNIK IZOTOPOWY: E2 oznakowany jodem125 (poziom HPLC) w roztworze etanolu</p>	Ag	^{125}I	CONC	1 fiolka 1 ml 142 kBq	Przenieść ilościowo roztwór etanolu do buforu znacznikowego
Ag	^{125}I	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Bufor znacznikowy z żelatyną bydlęcą i azydkiem (<0.1%)</p>	TRACER	BUF	1 fiolka 53 ml	Gotowe do zastosowania	
TRACER	BUF				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Kalibrator zerowy w ludzkiej surowicy z dodatkiem azydku (<0,5%)</p>	CAL	0	1 fiolka 0,5 ml	Gotowe do zastosowania	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Kalibratory E2 N = od 1 do 6 (dokładne wartości na etykietach fiolek w ludzkiej surowicy z dodatkiem azydku (<0,5%)</p>	CAL	N	6 fiolek 0,5 ml	Gotowe do zastosowania	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Roztwór płuczący (TRIS HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 fiolka 10 ml	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>Rozcieńczalnik próbek: surowica ludzka i azydek (<0,1%)</p>	DIL	SPE	1 fiolka 2,5 ml	Gotowe do zastosowania	
DIL	SPE				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Kontrole - N = od 1 do 2 w odczynie ludzkiej z tylolem</p>	CONTROL	N	2 fioleki materiał liofilizowany	Dodać 0.5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N				

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

Poniższe materiały są wymagane, ale nie są dostarczone w zestawie:

1. Woda destylowana
2. Pipety do dozowania: 50 μl i 500 μl (zaleca się korzystanie z dokładnych pipet z jednorazowymi końcówkami plastikowymi)
3. Mieszadło wirowe
4. Mieszadło magnetyczne
5. Łaźnia wodna w 37°C
6. Strzykawka automatyczna o objętości 5 ml (rodzaj Cornwall) do płukania
7. Układ do aspiracji (opcjonalnie)
8. Może być wykorzystywany jakkolwiek licznik gamma odpowiedni do pomiaru ^{125}I (minimalny uzysk 70%)

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- A. Znacznik** : Przenieść ilościowo roztwór etanolu do buforu znacznikowego i wymieszać.

- B. Kontrole**: Kontrole należy rekonstruować przy pomocy 0.5 ml wody destylowanej.
- C. Roboczy roztwór płuczący**: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

- Przed otwarciem lub rekonstrukcją wszystkie składniki zestawu zachowują trwałość do daty ważności przedstawionej na etykiecie, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C .
- Po rekonstrukcji, kontrole zachowują trwałość przez 1 tydzień, pod warunkiem przechowywania w temperaturze od 2 do 8°C . W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres czasu, należy przygotować niewielkie objętości kontroli, co pozwala przechowywać je w temperaturze -20°C przez 3 miesiące. Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania
- Świeżo przygotowany roboczy roztwór płuczący powinien być wykorzystany w tym samym dniu.
- Po rozcieńczeniu, znacznik zachowuje stabilność do daty ważności, jeżeli jest przechowywany w oryginalnej, dobrze zamkniętej fiolce w temperaturze od 2 do 8°C .
- Zmiany w wyglądzie fizycznym odczynników w zestawie mogą wskazywać na ich niestabilność lub zużycie.

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbkę surowicy muszą być przechowywane w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w niewielkich ilościach w temperaturze -20°C .
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.
- Rozcieńczenie próbek o wysokim stężeniu: dostarczony rozcieńczalnik zawiera niewielką ilość estradiolu i należy go zbadać w celu określenia tego stężenia. Tę wartość należy odjąć od stężenia próbek przed pomnożeniem wyników przez współczynnik rozcieńczenia.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności. Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową. Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie. Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji. Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

1. Dla każdego kalibratora, próbki i kontroli należy oznaczyć opłaszczone próbówki w badaniach podwójnych. W celu określenia całkowitych zliczeń należy oznaczyć 2 standardowe próbówki.
2. Szybko wymieszać wirując: kalibratory, próbki i kontrole, i dozować po 50 μl każdej substancji do odpowiednich próbek.
3. Do każdej próbówki, w tym do próbek nieopłaszczonych do całkowitego zliczenia, dodać po 500 μl E2 oznakowanego jodem 125 .
4. Delikatnie potrząsnąć statywem w celu uwolnienia uwieczonych pęcherzyków powietrza.
5. Inkubować przez 3 godziny w temperaturze 37°C w łaźni wodnej.
6. Aspirować (lub odlać) zawartość każdej próbówki (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia). Aby usunąć cały płyn należy upewnić się, że plastikowa końcówka aspiratora osiągnęła dno opłaszczonej próbówki.
7. Przepłukać próbówki przy pomocy 3 ml roboczego roztworu płuczącego (z wyjątkiem próbek do całkowitego zliczenia) i aspirować zawartość (lub odlać ją). W trakcie dodawania roboczego roztworu płuczącego należy unikać wytwarzania piany.
8. Pozostawić próbówki w pozycji stojącej do góry na dwie minuty i aspirować pozostałe krople płynu.
9. Zliczać próbówki w liczniku gamma przez 60 sekund.

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

1. Obliczyć średnią oznaczeń podwójnych.
2. Obliczyć związaną radioaktywność jako odsetek wiązania określonego w zerowym punkcie kalibracji (0) zgodnie z poniższym wzorem:

$$B/B_0(\%) = \frac{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora lub próbki)}}{\text{Liczba zliczeń (dla kalibratora zerowego)}} \times 100$$

3. Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości (B/B₀(%)) dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia E2 każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
4. Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomagania komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B₀ (%)) próbki należy określić stężenia E2 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego E2 (B₀/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

Poniższe dane są przedstawione wyłącznie w celach przykładowych i nie powinny być nigdy stosowane zamiast rzeczywistych krzywych kalibracyjnych.

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	69089	
Kalibrator		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia dwa kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyła standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 2,7 pg/ml.

B. Swoistość

Odsetek reaktywności krzyżowej, oceniany przez porównanie stężenia prowadzącego do 50% zahamowania, przedstawia się następująco:

Związek	Reaktywność krzyżowa (%)
Estron	1,0
Estriol	0,6
Etynylestriol	0,2
Progesteron	<0,0002
Testosteron	<0,001
Androstenodion	<0,001
Siarczan DHEA	<0,0002
Glukuronid 17-estriolu	<0,2
Kortyzol	<0,001
Ekwilina	<0,1
Walerian 17-estriolu	<0,1
Norgestrel	<0,0004
Androstenodiol	0,001

C. Precyzja

PRECYZJA W SERII

PRECYZJA MIĘDZY SERIAMI

Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Surowica	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIĘNCZENIA

Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (pg/ml)	Stęż. mierzone (pg/ml)	Odzysk (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

Próbka została rozcieńczona dostarczonym rozcieńczalnikiem. Stężenie endogennego estradiolu w rozcieńczalniku wynosiło 13 pg/ml i wartość tę odjęto od stężenia próbki przed zastosowaniem współczynnika rozcieńczenia.

Mierzone i teoretyczne stężenia były zgodne:

Y (zmierzona) = 0,99X (teoretyczna) - 0 ; R² = 0,999

BADANIE ODZYSKU

Próbka	Dodano E2 (pg/ml)	Teoretyczne E2 (pg/ml)	Mierzone E2 (pg/ml)	Odzysk (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Mierzone i teoretyczne stężenia były zgodne:

- Próbka 1: Y (zmierzona) = 1,11X (teoretyczna) + 0 ; R² = 0,999

Współczynnik konwersji:

Z ng/ml na nmol/l : x 3,68
Z nmol/l na ng/ml : x 0,272

Stężenia kalibratorów są oznaczone za pomocą metody referencyjne ID-GC/MS

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

Jak wykazano, wyniki pomiaru pozostają dokładne nawet wówczas, gdy od momentu dodania kalibratora do opłaszczonych próbek minęło 40 minut.

OPÓŹNIENIE

Surowica (pg/ml)	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

- Jeżeli wyniki uzyskane dla kontroli 1 i 2 nie znajdują się w zakresie określonym na etykiecie fiołki, wyniki nie mogą zostać wykorzystane dopóki nie uda się znaleźć właściwego wyjaśnienia tego odchylenia.
- Jeżeli to konieczne, każde laboratorium może wykonać własne próbki zbiorcze w celach kontrolnych, które powinny być zamrożone w małych objętościach.
- Dopuszczalne kryteria dotyczące różnicy pomiędzy wynikami oznaczeń podwójnych próbek powinny być zgodne z zasadami prawidłowej pracy w laboratorium.

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

Wartości są przedstawione wyłącznie w celach orientacyjnych, każde laboratorium powinno opracować własne wartości referencyjne.

	Zakres stężenia (percentylach od 2,5% do 97,5%.) (pg/ml)	Mediana stężenie (pg/ml)	Liczba osobników
Zdrowi mężczyźni	8 - 66	27	36
Zdrowe kobiety			
. Faza follikularna (dzień cyklu od -10 do -3)	35-147	69	49
. Faza przedowulacyjna (dzień cyklu -1 i 0)	70 - 490	135	13
. Faza lutealna (dzień od 3 do 10)	43 - 217	105	35
. Okres pomenopauzalny	19 - 49	31	39

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.

Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).

Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.

Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.

Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.

Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anty-HCV, anty-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.

Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydłace pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.

Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.

Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

- ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
- GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

- HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
- METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
- PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
- SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
- WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

	CAŁKOWITA LICZBA ZLICZEŃ μl	KALIBRATORY μl	PRÓBKI KONTROLE μl
Kalibratory (0 - 6)	-	50	-
Próbki, kontrole	-	-	50
Znacznik izotopowy	500	500	500
Inkubacja	3 godziny w temperaturze 37°C w łaźni wodnej		
Rozdzielenie Roboczy roztwór płuczący Rozdzielenie	- - -	Aspiracja 3,0 ml Aspiracja ostrożna	
Zliczanie	Zliczanie próbek przez 60 sekund		



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

E2-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

Имунорадиометричен набор за количествени измервания *in vitro* на човешки Естрадиол (E2) в серум.

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

- A. Патентовано име: DIAsource E2-RIA-CT Kit
- B. Каталоген номер: KIP0629: 96 теста
- C. Произведено от: DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

За техническа помощ или поръчка:
Тел.: +32 (0)10 84.99.11 Факс: +32 (0)10 84.99.91

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

17-бета естрадиол (E2) е C-18 стероиден хормон (с молекулно тегло 272.4 Da), произвеждан главно от яйчниците и плацентата, както и в малки количества от надбъбречните жлези и тестисите. Естрадиолът е в равновесие с естроена, който може да бъде преобразуван в естриол в черния дроб и плацентата.

B. Клинично приложение

Както при LH-FSH-прогестерона, измерването на концентрациите на естрадиол в серума, перитонеалната течност и фоликуларната течност е основен биохимичен инструмент за изследването на фертилността, наличието на туморни заболявания и такива на половите органи, както и на нарушения в системата полови жлези-хипофиза-хипоталамус, например:

- За детекция на фоликуларната фаза;
- За проверка ефективността на овулаторната индукция (с ултразвук) и нивото на E2 във фоликуларната течност, което дава възможност за детекция на нормална или дисфункционална овулаторна индукция (синдромът на празния фоликул може да отразява дисфункционална овулаторна индукция);
- За диагностика на синдрома на лутеинизиран неруптурирал фоликул (LUF) (чрез измерване на нивата на 17 бета естрадиол и прогестерон в перитонеалната течност);
- За подпомагане диагностиката на тумори на гърдата (активността на общите естрогени - E1-E2 - и 17 бета-хидроксистероид дахидрогеназата е значително по-висока при злокачествените, отколкото при доброкачествените тъкани на гърдата);
- При измерване на нивата на LH-FSH и E2 е възможно да се открие синдромът на Щайн Кохен Левентал (поликистозни яйчници);
- Други области на изследване са: преждевременно полово съзряване, гинекомастия и период на менопауза.

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество стероид, натоварен с ^{125}I , се конкурира със стероида, който трябва да се измери в пробата или в калибратора, за определено количество антитела, които са имобилизирани към стената на полистиреновата епруветка. Не се изискват нито екстракция, нито хроматография поради високата специфичност на покритите антитела. След 3 часа инкубация при температура 37°C конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват с 3 ml разтвор за измиване и се аспирират наново. Прави се калибрационна крива и се определят концентрациите на E2 чрез интерполация на дозата от калибрационната крива.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Приготвяне			
Епруветки, покрити с анти-E2	2 x 48	Готов за употреба			
<table border="1"> <tr> <td>Ag</td> <td>^{125}I</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: E2 натоварен с ^{125}I (HPLC) в разтвор на етилов алкохол</p>	Ag	^{125}I	CONC	1 флакон 1 ml 142 kBq	Пренесете количествено етаноловия разтвор в трейсърния буфер
Ag	^{125}I	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>TRACER</td> <td>BUF</td> </tr> </table> <p>Трейсърен буфер с волски желатин и азид (<0.1%)</p>	TRACER	BUF	1 флакон 53 ml	Готов за употреба	
TRACER	BUF				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>0</td> </tr> </table> <p>Нулев Калибратор в човешки серум и азид (<0.5%)</p>	CAL	0	1 флакон 0,5 ml	Готов за употреба	
CAL	0				
<table border="1"> <tr> <td>CAL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Калибратор - N = 1 до 6 (виж точните стойности на етикета на флаконите) в човешки серум и азид (<0.5%)</p>	CAL	N	6 флакона 0,5 ml	Готов за употреба	
CAL	N				
<table border="1"> <tr> <td>WASH</td> <td>SOLN</td> <td>CONC</td> </tr> </table> <p>Измиващ разтвор (TRIS-HCl)</p>	WASH	SOLN	CONC	1 флакон 10 ml	Разредете 70x с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
WASH	SOLN	CONC			
<table border="1"> <tr> <td>DIL</td> <td>SPE</td> </tr> </table> <p>Разредител за проби: човешки серум и азид (<0,1%)</p>	DIL	SPE	1 флакон 2,5 ml	Готов за употреба	
DIL	SPE				
<table border="1"> <tr> <td>CONTROL</td> <td>N</td> </tr> </table> <p>Контроли 1 и 2 в човешка плазма с тимол</p>	CONTROL	N	2 флакона лиофилизирани	Добавете 0.5 ml дестилирана вода	
CONTROL	N				

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

Следните материали са необходими, но не се осигуряват в набора:

1. Дестилирана вода
2. Пипети от: 50 μl и 500 μl (препоръчва се използването на прецизни пипети с накрайници за еднократна употреба).
3. Завихрящ смесител
4. Магнитен сепаратор
5. Водна баня при 37°C
6. 5 ml автоматична спринцовка (тип Cogwall) за измиване
7. Аспирационна система (по избор).
8. Всякакъв гама брояч, който може да измери употребеното количество ^{125}I (минимален капацитет от 70%)

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

A. Трейсър: Пренесете количествено разтвора на етилов алкохол в трейсърния буфер и разклатете

B. Контроли: Реконституирайте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.

B. Работен измиващ разтвор: Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70x). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

- Всички компоненти на кита са стабилни до датата на срока на годност, посочен на опаковката, при температура на съхранение от 2°C до 8°C преди отваряне или реконституиране.
- След реконституиране, контролите са стабилни за срок от 7 дни при температури $2-8^\circ\text{C}$. За по-дълги срокове на съхранение, се определя кратно и се съхранява при температура -20°C за максимум 3 месеца. Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Пряко приготвения Работен измиващ разтвор трябва да бъде използван същия ден.
- След разреждане, Трейсърът е стабилен до изтичане срока на годност, ако се съхранява в оригиналния добре затворен флакон при температури 2 до 8°C .
- Промени във физическия вид на реагентите на кита индицират нестабилност или негодност.

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхраняват при температури $2-8^\circ\text{C}$.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхраняването в аликвоти при -20°C .
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.
- Разреждане на проби с високи концентрации: предоставеният разредител съдържа малко количество естрадиол и трябва да се тества, за да се определи тази концентрация. Тази стойност трябва да бъде извадена от концентрацията на пробите преди умножаване на резултатите по фактора на разреждане.

X. ПРОЦЕДУРА

A. Общи бележки

Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура.

Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба.

Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация.

Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

1. Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
2. Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 50 μl от всяко в съответните епруветки.
3. Разпределете 500 μl E2, натоварен с ^{125}I в всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото преброяване.
4. Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
5. Инкубирайте за 3 часа при температура 37°C във водна баня.
6. Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
7. Измийте епруветките с 3 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
8. Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
9. Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

1. Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.

2. Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула:

$$B/B_0 (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$

3. Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B₀(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на E2 концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..
4. Компютърно асистираните методи също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
5. Чрез интерполация на (B/B₀ (%)) стойностите от пробата се определят E2 концентрациите на пробите от калибрационната крива.
6. Процентът на общото проследявано вещество, свързано при липса на ненатоварен E2 (B₀/T), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

Данните, изложени по-долу са само за илюстрация и никога не бива да се използват вместо истинската калибрационна крива.

E2-RIA-CT	срп	B/B ₀ (%)
Общ брой Калибратор	69089	
Калибратор		
0 pg/ml	29372	100,0
9 pg/ml	25237	85,9
27 pg/ml	21374	72,7
92 pg/ml	15669	53,4
430 pg/ml	8527	29,0
2200 pg/ml	2607	8,9
3900 pg/ml	1676	5,7

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

A. Определен лимит

двадесет и втора нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 2,7 pg/ml.

B. Специфичност

Процентът на кръстосана реакция, преценен чрез сравняване с концентрацията при 50% потискане, е съответно:

Съединение	Кръстосана реактивност (%)
Естрон	1,0
Естриол	0,6
Етинилестрадиол	0,2
прогестерон	<0,0002
тестостерон	<0,001
Андростендион	<0,001
DHEA-сулфат	<0,0002
Естрадиол-17- глюкуронид	<0,2
Кортизол	<0,001
Екуилин	<0,1
Естрадиол -17-валерат	<0,1
Норгестрел	<0,0004
Андростендиол	0,001

Г. Прецизност

ПО ВРЕМЕ НА ИЗПИТВАНЕТО

МЕЖДУ ИЗПИТВАНЕТО

Серум	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)	Серум	N	<X> ± SD (pg/ml)	CV (%)
A	20	80 ± 6,4	8,0	A	23	79 ± 11	13,9
B	20	141 ± 7,9	5,6	B	23	249 ± 26	10,4
C	20	249 ± 11,7	4,7				

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ

Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерената концентрация (pg/ml)	Възстановен (%)
1/1	1400,3	1387,3	100
1/2	700,2	659,0	96
1/4	350,1	358,0	106
1/8	175,1	158,0	98
1/16	87,5	64,9	89
1/32	43,8	29,3	97
1/64	21,9	11,9	114

Пробата е разредена с предоставения разредител. Ендогенният естрадиол в разредителя е 13 pg/ml и тази стойност се приспада от концентрацията на пробата, преди да се приложи факторът на разреждане.

Измерените и теоретични концентрации са в съответствие:
Y (измерена) = 0,99X (теоретична) – 0; R² = 0,999

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ

Проба	добавен E2 (pg/ml)	Теоретична E2 (pg/ml)	Измерената E2 (pg/ml)	Възстановен (%)
1	0	12,8	12,8	NA
	4,5	17,3	18,3	106
	13,5	26,3	22,3	85
	46,0	58,8	54,4	93
	215	227,8	207	91
	1100	1112,8	1104	99
	1950	1962,8	2259	115

Измерените и теоретични концентрации са в съответствие:
- Проба 1: Y (измерена) = 1,11X (теоретична) + 0 ; R² = 0,999

Конверсионен фактор:

От ng/ml до nmol/L : x 3,68
От nmol/L до ng/ml : x 0,272

Концентрациите на калибраторите са определени посредством ID-GC/MS референтен метод.

D. Закъснение

Както е показано по-долу, резултатите от изпитването остават точни дори когато пробата е разпределена 40 минути след като калибраторът е бил добавен към покритата епруветка.

Серум (pg/ml)	Закъснение				
	0'	10'	20'	30'	40'
C1	63	58	79	69	75
C2	217	229	274	235	237

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

- Ако резултатите, получени за Контрола 1 и/или Контрола 2 не са в рамките на нивото, указано на етикета на флакона, то резултатите не могат да бъдат използвани, освен ако не се предостави задоволително обяснение на това несъответствие.
- По желание, всяка лаборатория може да си направи собствен комплект от контролни проби, които трябва да се съхраняват замразени в кратни съотношения.
- Критериите за приемане на разликата от двойните резултати на пробите трябва да се опират на Добрата Лабораторна Практика.

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

Стойностите, показани по-долу, са предоставени само за напътствие; всяка лаборатория трябва да установи свои собствен нормален обхват на стойности.

	Интервал на концентрацията (2,5 до 97,5%) (pg/ml)	Средна концентрация (pg/ml)	Брой субекти
Нормални мъже	8 - 66	27	36
Нормални жени			
· Фоликуларна фаза (ден -10 до -3)	35-147	69	49
· Преовулаторен период (ден -1 & 0)	70 - 490	135	13
· Лутеална фаза (ден 3 до 10)	43 - 217	105	35
· След менопауза	19 - 49	31	39

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.

Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.

Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; поупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.

Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радионуклиди.

Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.

Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумите или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.

Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.

Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

- ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.
- GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258
- HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827
- METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17βHSD) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308
- PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.
- SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.
- WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

	ОБЩА АКТИВНОСТ µl	КАЛИБРАТОРИ µl	ПРОБА (И) КОНТРОЛИ µl
Калибратори (0-6) Проби, контроли Трейсьър	- - 500	50 - 500	- 50 500
Инкубация	3 часа при температура 37°C във водна баня		
Сепарация Измиващ разтвор Сепарация	- - -	аспирирайте 3,0 ml аспирирайте внимателно	
Броене	Отчетете епруветките за 60 секунди		

DIAsource E2-RIA [체외진단의료기기]

1. 제품개요

순번	항 목	내 용
1	품목명	내분비물질검사시약
2	제품명	DIAsource E2-RIA
4	허가번호	수인 15-285 호
4	사용목적	사람 혈청내 에스트라디올(E2)의 정량측정
5	포장단위	96 테스트/키트
6	저장방법	2-8 ℃ , 제조일로부터 70일
7	사용기한	2-8 ℃ , 제조일로부터 70일

2. 측정원리

고정된 양의 ¹²⁵I 표지 steroid가 polystyrene 시험관 벽에 고착 고정된 양의 항체 부위에 대해 표준용액내 혹은 검체 내에 있는 측정할 steroid와 결합 반응을 한다. 피복 항체의 높은 특이성 때문에 추출이나 chromatography가 필요하지 않다. 37°C에서 3시간 배양 후, 흡입 단계에서 결합 반응은 종결된다. 그런 후, 시험관은 세척액 3ml로 세척되고 다시 흡입되어진다. 표준곡선이 작성되고 검체의 E2 농도가 표준곡선의 내삽에 의해 결정되어진다.

3. 제공되는 시약

번호	명칭	구성
1	Coated tube	2 X 48
2	Tracer (¹²⁵ I labelled E2)	1 vial, 1ml
3	Tracer Buffer	1 vial, 53ml
4	Calibrator 0	1 vial, 0.5ml
5	Calibrator 1-6	6 vial, 0.5ml
6	Wash Solution	1 vial, 10ml
7	검체 희석액	1 vial, 2.5ml
8	Control I, II	2 vial, 동결건조

4. 측정방법

1) 검체 준비

- 혈청은 2-8°C에 보관한다.
- 측정이 24시간 안에 이루어지지 않는다면 혈청과 혈장 검체는 -20°C에 저장해야 한다.
- 반복적인 냉동, 해동은 피한다.

2) 시약 조제

- 트레이서 : 에탄올 솔루션을 트레이서 버퍼와 섞어 혼합한다.
- 정도관리 용액 : 0.5ml의 증류수로 재구성한다.
- 세척액 : 70배로 희석한다. 균질화하기 위해 마그네틱 교반기를 이용한다.

3) 검사 방법 (*자동화 장비 : Stratec SR300)

- 각 재구성 한 표준용액, 정도관리 용액, 트레이서를 pipetting stage에 준비한다.
- 검체를 50ul씩 준비하여 시험관 랙에 준비한다.
- 50ul의 표준용액, 정도관리용액, 트레이서 500ul를 차례대로 니들이 흡입 한 후, 검체가 든 시험관에 분주한다. 준비된 시험관에 차례대로 분주한다.
- 분주가 끝난 시험관은 incubation stage로 옮겨져 3시간 동안 37°C에서 반응한다.
- 반응이 끝난 후 rinsing stage로 옮겨져 3ml의 세척액으로 각 시험관이 세척되고 모두 흡입단계까지 이루어진다.
- 시험관이 detection stage로 옮겨져 5개의 detector로 시험관의 결과 값을 읽어낸다.

4) 결과판정

1) 자료정리

- 현저하게 벗어난 값은 제외하고, 중복된 측정의 평균값을 계산한다.
- 아래의 공식에 따라 0번 표준용액 점(0)에서 측정된 결합형 백분율로 결합형 방사능을 계산한다

$$B/T = \text{계수율 (Std 또는 검체)} / \text{총계수율} \times 100$$
- 3 cycle 반대수 또는 logit-log 그래프 용지를 사용하여 각 표준용액 점의 E2 농도의 함수로서 각 standard 점에 대한 $(B/B_0 \times 100)$ 수치를 작성한다. 또한 컴퓨터지원 계산 방법도 표준곡선의 작성에 사용될 수 있다.
- 표준곡선으로부터 검체 $(B/B_0 \times 100)$ 값의 내삽으로 검체 E2 농도를 결정한다.
- 각 측정에 대해, 표지되지 않은 E2가 부재한 가운데에서의 총 트레이서 결합 백분율 (B_0/T) 이 확인되어야 한다.

(2) 참고치

5. 완제품 시험규격

1) 외관검사

제조원의 품질관리표준지침서(문서번호 POCQ075)에 따라 시험하고, 확인양식(문서번호 FTPK004)에 기입하고 확인한다.

(1) 문서번호 ITPKKIP0629에 기입된 대로 구성품이 일치하는지 확인한다

구 분	대상자 수	중간값 (pg/ml)	범위(2.5~97.5%) (pg/ml)
남성	59	27	8-66
여성			
· 초기 난포기			
· 전배란기 절정			
· 황체기			
· 폐경기 후	35	137	35-147
	33	176	70-496
	40	119	43-217
	72	19	19-49
임산부	20		510-6300
· 첫 번째 3분기	26		2400-18900
· 두 번째 3분기	20		1900-37100
· 세 번째 3분기			

(2) 제품 구성표의 lot와 키트안의 구성품이 일치하는지 확인

(3) 구성품과 키트의 유효기간을 확인

(4) 구성품의 라벨상태를 확인

(5) 구성품의 포장상태를 확인(용량, 물질 등)

(6) 서류가 맞게 있는지 확인(사용설명서, 품질서류 등)

(7) 박스에 라벨이 정확히 부착되어 있는지 확인

(8) 검사 후 담당자는 확인양식(FTPK004)에 기입하고 서명한다.

2) 성능시험 (제조원의 품질관리 표준지침서(문서번호 POCQ006)에 따라 시험한다.

- 총 계수는 허용범위 (55,000-75,000 cpm) 내에 있어야 한다
- 표준용액 0의 결합률은 허용범위(29.3-45.4%) 내에 있어야 한다
- 표준용액 1의 결합률은 허용범위(77.3-87.3%) 내에 있어야 한다
- 표준용액 6의 결합률은 허용범위(4.7-8.1%) 내에 있어야 한다
- 키트 정도관리용액에서 얻어진 값이 허용범위 내에 있어야 한다

control I 35.0-65.0 pg/ml

control II 175-325 pg/ml

(6) 표준물질은 허용범위 내에 있어야 한다

Calibrator 1 : 9.8-18.2 pg/ml

Calibrator 2 : 35.0-65.0 pg/ml

Calibrator 3 : 105-195 pg/ml

Calibrator 4 : 350-650 pg/ml

Calibrator 5 : 1400-2600 pg/ml

Calibrator 6 : 2800-5200 pg/ml

비고 : 각 로트의 허용범위는 방사면역 측정을 위한 표준지침서(문서번호

CACQKIP0629)에 기록되어 있다.

(허용범위는 평균값의 $\pm 3SD$ 를 기준으로 측정된다)

6. 사용시 주의사항

- 체외진단용으로만 사용하여야 하며, 체외진단용 이외 흡입이나 체내 투여 등을 금지한다.
- 동 제품에 포함된 방사성동위원소 취급 시 다음 사항을 준수하여야 한다.
 - 방사성동위원소는 지정된 장소에 보관하며, 관련 법령에 따라 자격을 갖춘자가 지정된 장소에서 사용한다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때 안전에 영향을 주는 불필요한 행동을 하지 않는다. (예, 음식 섭취, 흡연, 화장 등)
 - 방사성동위원소를 포함한 시약을 분주해야 하는 경우, 입으로 파이펫팅 하지 않는다.
 - 방사성동위원소를 취급할 때에는 장갑 및 실험복을 착용하며, 검사가 완료되면 손을 깨끗이 닦는다.
- 유출된 모든 물질은 즉시 닦아 낸 후 폐기 또는 취급에 관련된 소관 법령에 따라 처리하여야 하며, 방사성 물질의 오염이나 방사성 물질 등의 분실은 관련 법령에 정한 규정된 절차에 따라 처리한다.
- 검사를 실시하기 전에 모든 제품(구성품 포함)은 해당 제품별 검사 온도 조건에 따라 실시한다.
- 그밖에 방사성동위원소의 보관, 이동, 사용 및 폐기 등 취급에 관한 사항은 관련 법규 또는 규정에 따른다.
- 본 kit 내의 혈액성분은 시험을 거쳤고, HbsAg, 항HIV 1와 항 HIV 2에 대한 반응은 없었다. 알려져 있는 어떠한 방법으로도 간염, AIDS, 감염성혈액 성분 같은 감염성 물질의 부재를 확신시킬 수 없다 그러므로 시약과 환자

DIAsource E2-RIA [체외진단의료기기]

검체의 취급은 병원내의 안전절차에 따라야 한다.

- 6) 시약이 피부에 접촉되지 않게 하라(요오드화나트륨 방부제). 본 kit 내의 요오드화합물은 배관계통의 납과 구리와 반응하여 큰 폭발성을 가진 요오드화금속으로 변화할 수 있다. 세척 단계에서 요오드화합물의 생성을 막기 위해 흐르는 물로 배수관을 씻어 내도록 한다.
- 7) 방사성물질의 취득과 저장에 대한 일지는 실험실 내에 보관되어야 한다. 방사성 물질로 오염될 수 있는 서로 다른 방사성물질에 의한 교차 오염을 예방하기 위해 실험실 기구와 유리제품은 서로 분리 되어져야 한다.
- 8) 방사성 물질이 쏟아진 경우에는 방사선안전 절차에 따라 즉시 제염하여야 한다. 방사성 폐기물은 특정 규정과 실험실의 관할권을 가지고 있는 신고당국의 지침에 따라 처리되어 야만 한다. 방사선안전에 대한 기본 규칙의 준수는 충분한 방호를 제공한다.