



IVD

CE

# ESTRONE-RIA-CT

*KIPI9100*

---

Version : 230123

Date of issue : 23/01/2023

Revision date: 23/01/2023

# History

---

## Summary of change:

<b>Current Version:</b>
<b>230123</b>
New logo



# ESTRONE-RIA-CT

Radioimmunoassay for the Quantitative Determination of Estrone in Human Serum or Plasma

KIPI9100

**IN VITRO DIAGNOSTIC USE**

en

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. INTENDED USE:** For IN VITRO determination of serum or plasma ESTRONE levels.

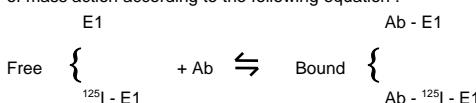
The origin of plasma estrogens in women has been precisely studied by refined isotopic dilution techniques.

In normal women, most plasma estradiol is derived from the ovary, where theca cells secrete androstenedione, which is then converted to estrone and then to estradiol by the granulosa cells.

Little estrone is indeed formed and secreted by the ovary : most originates from a peripheral conversion of estradiol and from the aromatization of androstenedione, a catalytic reaction essentially carried out in adipose tissue. In premenopausal women, androstenedione is secreted by the ovary and the adrenals. In pregnant women, the fetal adrenal gland provides a significant contribution to androstenedione production. In menopausal women, estrone is the essential estrogen found in the circulation, resulting from the conversion of adrenal androstenedione. An increase in estrogen formation occurs with aging and in correlation with the amount of adipose tissue. The estrogenic effects of estrone in menopausal women can produce endometrial hyperplasia and bleeding but also maintains the bone mineral content. In premenopausal women, excessive estrone blood levels can result from the conversion of large amounts of androstenedione produced in micropolyzystic ovary syndrome and ovarian tumors. In such women, high estrone blood levels can participate in a disturbance of the menstrual cycle.

Estrone in the circulation is essentially bound to albumin. This is important in the interpretation of estrone-assay data. Indeed, and contrary to estradiol, total estrone levels are not significantly modified by SHBG concentration.

**2. PRINCIPLE OF THE METHOD:** The ESTRONE (E1) CT RIA obeys the law of mass action according to the following equation :



Since the concentrations of  ${}^{125}\text{I}$  - E1 and coated antibodies are constant, the advancing state of the equation depends on the concentration of E1. The amount of  ${}^{125}\text{I}$  - E1 bound to the coated tube is inversely proportional to the concentration of E1 in the sample.

Following the incubation, the tube is washed to remove excess of unbound  ${}^{125}\text{I}$  - E1.

Patient samples concentration are read from a calibration curve.

**3. MATERIAL PROVIDED AND STORAGE:**

Stored at 2 - 8°C, the material can be used up to the expiration date printed on each label.

- 3.1. 2 x 48 Polystyrene tubes (12 x 75 mm) coated with anti-Estrone polyclonal antibodies.  
Systematically allow the coated tubes to reach room temperature before use  
Store the unused tubes at 2-8°C.

- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 yellow, 42 ml  
1 bottle of  ${}^{125}\text{I}$ -labelled ESTRONE in buffer with a stabilizer, a preservative ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ) and a yellow dye.  
Each bottle contains less than 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ )

- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 1 ml in each vial except for Calibrator 0 : 2 ml  
 $N = 0$  to 5  
6 vials of ESTRONE in serum containing preservative ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ).  
The concentrations are printed on the vial labels. Store at 2-8°C for up to 12 weeks. For longer periods, store at -20°C.

- 3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 vials, lyophilized - N=1 or 2  
2 vials of human plasma containing preservatives ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). The controls are to be assayed along with the patient samples. The ranges for the controls are printed on the vial labels. Before use, reconstitute the content of the controls with 1 ml of distilled water. After reconstitution, the controls are stable for 7 days at 2-8°C. For longer periods, the controls should be aliquoted and kept at -20°C for maximum 3 months. Avoid freeze/thaw cycles.

- 3.5. 

WASH	SOL	CONC
------	-----	------

 70 x concentrated, 10 ml  
1 bottle concentrated buffered solution containing sodium azide ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Pour the solution in 700 ml of distilled water. The reconstituted washing solution is stable for 2 weeks at 2-8°C covered with adhesive film to avoid contamination.

**4. MATERIAL REQUIRED BUT NOT PROVIDED:**

- bench surfaces protected by absorbent paper to reduce the effects of radioactive spillage.
- waste disposal containers appropriately labelled and designed as suitable for solid or liquid radioactive materials.
- manual or automated precision micropipettes for dispensing samples or reagents without cross-contamination.
- absorbent paper.
- vacuum pump connected through a trap for aspiration
- horizontal shaker (max 300 rpm)
- a gamma scintillation counter.

**5. METHODOLOGY**

5.1. Collection and handling of blood samples:

The blood sample may be collected into a dry tube or one containing an anticoagulant. If heparin is used, only the minimum required should be added to avoid clotting.

After separation from the red blood cells, plasma or serum samples may be assayed immediately, within 24 hours if stored at 2 - 8°C, or later, after period up to several months if stored at -20°C. Repeating freezing and thawing must be avoided.

5.2. Assay procedure :

Reagents stored at 2°- 8° C. must be brought at room temperature prior to use. Do not mix reagents of different lots. Label the tubes for T (« Total Counts » do not use coated tubes) calibrators, samples and control sera.

Perform the assay in duplicate. Calibrators, controls and samples must be assayed at the same time.

1. Calibrator curve:

Pipette 100  $\mu\text{l}$  of each calibrator into the corresponding tubes.

2. Unknowns and controls:

Pipette 100  $\mu\text{l}$  of each sample or control into the corresponding tubes.

3. Add 400  $\mu\text{l}$  of  ${}^{125}\text{I}$  - ESTRONE tracer to each tube.

4. Vortex, cover and incubate 2 hours at room temperature on a horizontal shaker (max. 300 rpm).

5. Carefully aspirate or decant the solution of all tubes. (Except total counts tubes)

6. Add 2 ml of washing solution to each tube. Aspirate or decant carefully. (Except total counts tubes)

7. Repeat step 6.

8. Count the radioactivity fixed in each tube for at least 60 seconds.

5.3. Data processing:

Determine the mean count rate for each set of duplicate tubes.

Calculate the ratio B/B0 as follows :

$$B/B0 \% = [ \text{Calibrator or Smp cpm} / B0 (\text{Calibrator 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Draw the calibrator curve by plotting the ratio B/B0 % (linear scale) obtained for each calibrator versus its respective concentration expressed in pg/ml (logarithmic scale). ESTRONE concentrations in samples may be read directly from the calibrator curve.

If a computer is used to calculate the results, the data can be fitted to the appropriate equation : weighed 4 PL.

**5.4. Example of a typical assay:**

	Contents (pg/ml)	cpm 1st duplicate	cpm 2nd duplicate	Mean count rate	B/Bo (%)	Estrone (pg/ml)
Total counts	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 low	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 high	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Sample 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Sample 2	-	8490	8512	8502	56.5	149.1

Example of a typical assay, do not use for calculations

**6. PERFORMANCE CHARACTERISTICS:**

**6.1. Specificity**

Steroid	% Cross-reactivity
Estrone	100.0
Estradiol	0.03
Estriol	0.005
DHEA-S	0.0003
Androstenedione	N.D.
Progesterone	N.D.
Testosterone	N.D.
Estrone - Sulfate	N.D.
17 OH Progesterone	N.D.

**6.2. Minimum detectable concentration of ESTRONE:**

The minimum detectable concentration has been assayed at 3.2 pg/ml and corresponds to the concentration given by two standard deviations below the mean cpm of 20 replicate determinations of the zero calibrators.

**6.3. Recovery test:**

When sera of known ESTRONE contents have their ESTRONE supplemented by addition of ESTRONE, a satisfactory correlation between added and assayed ESTRONE is obtained.

Added E1 (pg/ml)	0	25	125
Assayed E1 (pg/ml)	92.8	57.3	115.3
% recovery	-	97.3	106

**6.4. Dilution test :**

The dilution test indicates that there is immunological identity between the ESTRONE present in the sample and the ESTRONE used to calibrate the calibrator curve.

Dilution Factor	1	1/2	1/4	1/8
Assayed E1 (pg/ml)	179.1	87.2	44.4	23.4
Expected E1 (pg/ml)	-	89.6	44.8	22.4
% recovery	-	97.3	99	104.5

**6.5. Reproducibility:**

	Mean value (pg/ml)	Within assay variation (% CV) 10 replicates	Between assay variation (% CV) 5 Separate assays in duplicate
Pool 1	27.03	5.0	10.55
Pool 2	114.02	3.0	6.29
Pool 3	227.2	10.9	8.89

**7. LIMITATION OF THE PROCEDURE**

7.1. The results obtained from this or any other diagnostic kit should be used and interpreted only in the context of an overall clinical picture.

7.2. Do not use lipemic, haemolyzed, icteric or turbid specimens.

**8. EXPECTED VALUES**

It is recommended that each laboratory establishes its own reference values.

	Estrone (pg/ml)
Males	10 - 60
Females	
Follicular phase	50 - 100
Luteal phase	100 - 300
Menopausal	ND - 60

**9. WARNING AND PRECAUTION**

**For IN VITRO DIAGNOSTIC use only**

**CAUTION : Radioactive material**

This kit contains  $^{125}\text{I}$  (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and  $\gamma$  (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.

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

**WARNING : Sodium azide**

Some components contain sodium azide as preservative agent ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Dispose of the reagents by flushing with large amount of water through the plumbing system.

**WARNING : Potentially infectious material**

Handle all components (and all patient samples) as if capable of transmitting viral diseases such as hepatitis B and C and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS).

Source material derived from human body fluids or organs and used in the preparation of this kit were tested and found negative for HBsAg and anti-HCV by immunoassay. However, no known test can guarantee that such material does not contain the causative agent of viral hepatitis.

Likewise, all human materials used in the preparation of this kit were screened for the presence of antibodies against HIV-1 and -2 by enzyme-immunoassay and were found negative. However, absence of this antibody cannot guarantee the absence of the viral agent responsible for the acquired immunodeficiency syndrome.

**10. BIBLIOGRAPHY**

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Canez MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Fairman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.

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



# ESTRONE-RIA-CT

Pour la détermination quantitative de l'Estrone dans le sérum humain ou le plasma  
KIP19100  
**IN VITRO DIAGNOSTIC USE**

fr

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. INTERET DU DOSAGE:** Trousse pour la détermination IN VITRO du taux d'ESTRONE dans le sérum ou le plasma.

L'origine des oestrogènes plasmatiques a été étudiée par des techniques de dilution isotopique.

Chez la femme normale, la plus grande partie de l'estadiol plasmatique provient de l'ovaire où les cellules theca secrètent de l'androstenedione lequel est alors converti en estrone et ensuite en estradiol par les cellules granulocytaires.

Un peu d'estrone est cependant formé et secrété par l'ovaire. La plupart de l'estrone provient d'une conversion périphérique d'estadiol et de l'aromatase de l'androstenedione, une réaction catalytique essentielle effectuée dans les tissus adipeux.

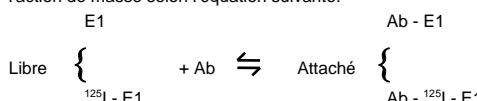
Chez la femme enceinte, la glande surrénale fœtale produit une contribution à la production d'androstenedione. Chez la femme ménopausée, l'estrone est l'oestrogène essentiel trouvé dans la circulation, résultant de la conversion d'androstenedione surrénalien.

Un accroissement de la formation d'oestrogènes se produit avec l'âge et en corrélation avec la quantité de tissus adipeux. L'effet oestrogénique de l'estrone chez la femme ménopausée peut produire une hyperplasie endométriale et des saignements et maintient le contenu minéral des os.

Chez la femme prémenopausée, des niveaux élevés d'estrone sanguin peuvent résulter d'une grande quantité d'androstenedione produite par le syndrome d'ovaire micropolykystique et de tumeurs ovarianes. Chez de tels patients, un niveau élevé d'estrone plasmatique peut participer à un dérèglement du cycle menstruel.

Dans la circulation, l'estrone est essentiellement liée à l'albumine. Ceci est important dans l'interprétation des données. Cependant, et contrairement à l'estadiol, les taux d'estrone total ne sont pas significativement modifiés par la concentration de SHBG.

**2. PRINCIPE DE LA METHODE:** L'ESTRONE (E1) CT RIA obéit à la loi de l'action de masse selon l'équation suivante:



Puisque les concentrations de  ${}^{125}\text{I}$  - E1 et les anticorps coâtés sont constants, l'état d'avancement de l'équation dépend de la concentration en E1. L'importance de  ${}^{125}\text{I}$  - E1 attaché au tube coâté est inversément proportionnelle à la concentration de E1 dans l'échantillon.

Après l'incubation, le tube est lavé afin de retirer l'excès du non attaché marqué.

La concentration des échantillons du patient est lue sur une courbe de calibration.

**3. MATERIEL FOURNI ET ENTREPOSAGE:**

Entreposé à 2 – 8°C, le matériel peut être utilisé jusqu'à la date d'expiration inscrite sur chaque étiquette.

- 3.1. 2 x 4 tubes en polystyrene (12 x 75 mm) coâtés avec des anticorps polyclonaux anti-Estrone.  
Systématiquement, permettre aux tubes coâtés d'atteindre la température ambiante avant utilisation.  
Entposer les tubes non utilisés à 2 – 8°C.

- 3.2. Ag 125I Traceur – jaune – 42 ml  
1 flacon  ${}^{125}\text{I}$ -ESTRONE coâté dans un tampon avec stabilisateur, un préservateur ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) et une matière colorante jaune.  
Chaque flacon contient moins de 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ )

- 3.3. CAL N 1 ml dans chaque fiole à l'exception du Std 0 : 2 ml  
 $N = 0 \text{ à } 5$   
6 fioles ESTRONE en sérum contenant un préservateur ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Les concentrations sont indiquées sur les étiquettes. Entposer à 2 – 8°C jusqu'à 12 semaines. Pour des périodes plus longues, entreposer à -20°C.

- 3.4. CONTROL N 2 fioles lyophilisées - N=1 ou 2  
2 fioles de plasma humain contenant des préservateurs ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Les contrôles doivent être réalisés en même temps que les échantillons des patients. Les valeurs des contrôles sont indiquées sur les étiquettes des fioles.  
Avant utilisation, reconstituer le contenu des contrôles avec 1 ml d'eau distillée. Après reconstitution, les contrôles sont stables pendant 7 jours à une température comprise entre 2 et 8 °C. Pour les périodes plus longues, les contrôles doivent être aliquotés et conservés à -20 °C pendant 3 mois maximum. Évitez les cycles de gel / dégel.

3.5. WASH SOLN CONC

70 x concentré, 10 ml

1 flacon de solution concentrée et tamponnée contenant de l'azoture de sodium ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Mettre en solution dans 700 ml d'eau distillée. La solution de lavage reconstituée est stable pendant 2 semaines à 2-8 °C et recouverte d'un film adhésif pour éviter toute contamination.

**4. MATERIEL REQUIS MAIS NON FOURNI:**

- Les surfaces de travail doivent être protégées par du papier absorbant afin de réduire les effets des émanations radioactives.
- Conteneurs pour déchets correctement étiquetés et désignés comme étant appropriés pour le matériel radioactif liquide et solide.
- Micropipettes précises soit manuelles soit automatisées pour la préparation des échantillons ou des réactifs sans contamination croisée.
- Papier absorbant.
- Pompe à vide connectée à une trappe pour l'aspiration.
- Shaker horizontal (max 300 rpm)
- Un compteur de scintillation gamma.

**5. METHODOLOGIE:**

5.1. Collecte et maniement des échantillons de sang:

L'échantillon de sang peut être collecté dans un tube sec ou un tube contenant un anticoagulant. Si de l'héparine est utilisée, seulement le minimum requis doit être ajouté pour éviter un caillot.

Après la séparation des globules rouges, les échantillons de plasma ou de sérum peuvent être utilisés immédiatement, dans les 24 heures s'ils sont entreposés à 2 – 8°C, ou plus tard, après une période pouvant aller jusqu'à plusieurs mois s'ils sont entreposés à -20°C. Les congélations et décongélations répétées doivent être évitées.

5.2. Procédure d'analyse:

Les réactifs entreposés à 2°- 8° C doivent atteindre la température ambiante avant toute utilisation. Il ne faut jamais mélanger les réactifs provenant de différents lots. Etiqueter les tubes pour T (« Total Counts » ne pas utiliser de tubes coâtés standards, échantillons et sérum de contrôle).

Réaliser les manipulations en double. Les standards, les contrôles et les échantillons doivent être préparés en même temps.

1. Courbe standard:

Pipetter 100  $\mu\text{l}$  de chaque standard dans les tubes correspondants.

2. Echantillons inconnus et contrôles:

Pipetter 100  $\mu\text{l}$  de chaque échantillon ou de contrôle dans les tubes correspondants.

3. Ajouter 400  $\mu\text{l}$  de  ${}^{125}\text{I}$  - ESTRONE traceur dans chaque tube.

4. Agiter, couvrir et incuber 2 heures à température ambiante sur un shaker horizontal (max. 300 rpm).

5. Aspirer soigneusement ou décanter la solution de tous les tubes. (à l'exception des tubes "Total Counts").

6. Ajouter 2 ml de solution de lavage dans chaque tube et aspirer (à l'exception des tubes "Total Counts").

7. Répéter l'étape 6.

8. Compter la radioactivité fixée dans chaque tube pendant au moins 60 secondes.

5.3. Traitements des données:

Déterminer la moyenne pour chaque série de tubes.

Calculer le ratio B/B0 de la manière suivante :

$$B/B0 \% = [ \text{Std or Smp cpm} / B0 (\text{Std 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Dessiner la courbe standard en traçant le ratio B/B0 % (échelle linéaire) obtenu pour chaque standard versus sa concentration respective exprimée en pg/ml (échelle logarithmique). Les concentrations en ESTRONE peuvent être lues directement à partir de la courbe standard.

Si un ordinateur est utilisé pour calculer les résultats, les données peuvent être ajustées par l'équation appropriée: 4 PL pondérée.

#### 5.4. Exemple d'une courbe typique:

	Contenu (pg/ml)	cpm 1st en double	cpm 2nd en double	Moyenne cpm	B/Bo (%)	Estrone (pg/ml)
Activité totale	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 low	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 high	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Echantillon 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Echantillon 2	-	8490	8512	8501	56.5	149.1

Exemple d'une estimation typique, à ne pas utiliser pour les calculs

#### 6. CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE:

##### 6.1. Spécificité:

Steroid	% Réactions croisées
Estrone	100.00
Estradiol	0.03
Estriol	0.005
DHEA-S	0.0003
Androstenedione	N.D.
Progesterone	N.D.
Testostérone	N.D.
Estrone – Sulfate	N.D.
17 OH Progesterone	N.D.

##### 6.2. Concentration minimale détectable d'ESTRONE:

La concentration minimale détectable est estimée à 3.2 pg/ml et correspond à la concentration donnée par 2 déviations standards en dessous de la moyenne cpm de 20 déterminations répliquées du standard 0.

##### 6.3. Test de recouvrement:

Quand un sérum au contenu connu d'ESTRONE voit sa valeur augmentée par l'addition d'une quantité connue d'ESTRONE, une corrélation satisfaisante entre l'ESTRONE ajoutée et estimée est obtenue.

Ajout E1 (pg/ml)	0	25	125
Valeur observée E1 (pg/ml)	92.8	57.3	115.3
% récupération	-	97.3	106

##### 6.4. Test de dilution:

Le test de dilution indique qu'il y a identité immunologique entre l'ESTRONE présente dans l'échantillon et l'ESTRONE utilisée pour calibrer la courbe standard.

Facteur de dilution	1	1/2	1/4	1/8
Valeur. observée E1 (pg/ml)	179.1	87.2	44.4	23.4
Valeur attendue E1 (pg/ml)	-	89.6	44.4	22.4
% récupération	-	97.3	99	104.5

##### 6.5. Reproductibilité:

	Valeur moyenne (pg/ml)	Variation intra essai (% CV) 10 replicates	Variation inter essai (% CV) 5 essais différents en double
Pool 1	27.03	5.0	10.55
Pool 2	114.02	3.0	6.29
Pool 3	227.2	10.9	8.89

#### 7. LIMITATION DE LA PROCEDURE:

- Les résultats obtenus à partir de ceci ou de tout autre kit de diagnostic devraient être utilisés et interprétés seulement dans le contexte d'une image clinique globale.
- Ne pas utiliser d'échantillons lipémiques, hémolysés, ictériques ou troubles.

#### 8. VALEURS ATTENDUES:

Il est recommandé que chaque laboratoire établisse ses propres valeurs de référence.

	Estrone (pg/ml)
Hommes	10 - 60
Femmes	
Phase folliculaire	50 - 100
Phase lutéale	100 - 300
Ménopause	ND - 60

#### 9. DANGERS ET PRÉCAUTIONS.

##### A utiliser uniquement pour des diagnostics in vitro

##### PRUDENCE: matériel radioactif

Cette trousse contient de l'I<sup>125</sup>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.

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.

##### DANGER: azoture de sodium

Certains composants contiennent de l'acide de sodium comme agent préservatif (NaN<sub>3</sub> < 0,1%). Se débarrasser des réactifs en versant de grande quantité d'eau par le système de plomberie.

##### DANGER: matériel potentiellement infectieux

Manipuler tous les composants (et tous les échantillons des patients) comme s'ils sont capables de transmettre des maladies virales comme l'hépatite B et C et le syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA).

Le matériel d'origine provenant d'organes et de liquides du corps humain et utilisé dans la préparation de ce kit ont été testé et ont obtenu des résultats négatifs pour l'hépatite B et C antigène de surface par immunoassay. Cependant, aucun test connu ne peut garantir qu'un tel matériel ne contient pas d'agent causatif d'hépatites virales.

De plus, tous les matériaux humains utilisés dans la préparation de ce kit ont été examinés afin de déterminer la présence d'anticorps HIV-1 et 2 et ont obtenu des résultats négatifs par immunoassay enzymatique. Cependant, l'absence de cet anticorps ne peut garantir l'absence d'un agent viral responsable du syndrome d'immunodéficience acquis (SIDA).

#### 10. BIBLIOGRAPHIE

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Caney MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Faiman C, Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Östron in  
Humanserum oder -plasma  
KIP19100  
IN VITRO DIAGNOSE

de

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1. VERWENDUNGSZWECK:** IN VITRO Bestimmung der ÖSTRON-Werte in Serum oder Plasma.

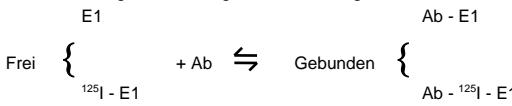
Die Herkunft von Östrogenen im Plasma wurde bei Frauen durch verfeinerte Isotopenverdünnungstechnik genau untersucht.

Bei gesunden Frauen stammt der größte Anteil von Östradiol im Plasma von den Ovarien, wo Thekazellen Androstendion sezernieren, das durch die Granulosazellen in Östron und dann in Östradiol umgewandelt wird.

Durch die Ovarien wird nämlich wenig Östron gebildet und sezerniert: Der Großteil stammt aus einer peripheren Konversion von Östradiol und aus der Aromatisierung von Androstendion, einer katalytischen Reaktion, die vor allem in Fettgewebe stattfindet. Bei prämenopausalen Frauen wird Androstendion durch die Ovarien und die Nebennieren sezerniert. Bei schwangeren Frauen tragen die Nebennieren des Fötus in bedeutendem Ausmaß zur Produktion von Androstendion bei. Bei menopausalen Frauen ist Östron das wichtigste, im Kreislauf gefundene Östrogen und stammt aus der Umwandlung adrenaler Androstendions. Mit zunehmendem Alter und in Zusammenhang mit der Menge an Fettgewebe steigt die Östrogenbildung. Die östrogene Wirkung von Östron bei menopausalen Frauen kann zu Endometriumhyperplasie und Blutungen führen, erhält aber auch den Knochenmineralgehalt. Bei prämenopausalen Frauen können überhöhte Östronwerte im Blut aus der Umwandlung großer Mengen Androstendion stammen, die bei mikropolyzystischem Ovarialsyndrom und Ovarialtumoren gebildet werden. Bei solchen Frauen können hohe Östronspiegel im Blut zu einer Störung des Menstruationszyklus beitragen.

Östron ist im Blutkreislauf vor allem an Albumin gebunden. Das ist für die Interpretation von Daten aus Östron-Assays wichtig. Im Gegensatz zu Östradiol ist es nämlich so, dass die Gesamtöstronwerte durch SHBG-Konzentration nicht wesentlich verändert werden.

**2. TESTPRINZIPIUM:** Der ÖSTRON (E1) CT RIA unterliegt dem Gesetz der Massenwirkung nach der folgenden Gleichung:



Da die Konzentrationen an  ${}^{125}\text{I} - \text{E1}$  und beschichteten Antikörpern konstant sind, hängt der Fortgang der Gleichung von der Konzentration von E1 ab. Die Menge an  ${}^{125}\text{I} - \text{E1}$ , die an die beschichteten Röhrchen gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur E1-Konzentration in der Probe.

Nach der Inkubation wird das Röhrchen gewaschen, um Überschüsse an nicht gebundenem  ${}^{125}\text{I} - \text{E1}$  zu entfernen.

Die Konzentrationen der Patientenproben werden aus einer Standardkurve abgelesen.

**3. MITGELIEFERTES MATERIAL UND LAGERUNG:**

Bei Lagerung bei 2 - 8°C kann das Material bis zum Verfalldatum verwendet werden, das auf jedes Etikett gedruckt ist.

3.1. 2 x 48 Polystyrenröhrchen (12 x 75 mm), beschichtet mit polyclonalen Anti-Östron Antikörpern.  
Vor Gebrauch müssen die beschichteten Röhrchen Raumtemperatur erreicht haben.  
Nicht verwendete Röhrchen bei 2 - 8°C lagern.

3.2. Gelb, 42 ml.  
1 Flasche mit  ${}^{125}\text{I}$ -markiertem ÖSTRON in Puffer mit Stabilisator, Konservierungsmittel ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) und gelben Farbstoff.  
Jede Flasche enthält weniger als 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ ).

3.3. CAL N  
1 ml in jedem Gefäß außer für Kalibrator 0: 2 ml.  
 $\text{N} = 0$  bis 5.

6 Gefäße ÖSTRON in Serum mit Konservierungsmittel ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ).  
Die Konzentrationen sind auf den Gefäßetiketten angeführt.

Lagerung bei 2 - 8°C 12 Wochen lang möglich. Lagerung für längere Zeit bei -20°C.

3.4. CONTROL N  
2 Fläschchen, lyophilisiert -  $\text{N} = 1$  oder 2  
2 Gefäße Humanplasma mit Konservierungsmittel ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Die Kontrollen müssen gemeinsam mit den Patientenproben im Assay getestet werden. Die Bereiche für die Kontrollen sind auf die Gefäßetiketten gedruckt.  
Vor dem Gebrauch müssen die Inhalte der Kontrollen mit 1 ml destilliertem Wasser rekonstituiert werden. Nach der Rekonstitution sind die Kontrollen 7 Tage bei 2-8 °C stabil.  
Für längere Zeiträume sollten die Kontrollen aliquotiert und bei -20 °C für maximal 3 Monate aufbewahrt werden.  
Einfrieren / Auftauen vermeiden.

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x konzentriert, 10 ml.  
1 Flasche konzentrierte Pufferlösung mit Natriumazid ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Lösung in 700 ml destilliertes Wasser gießen. Die rekonstituierte Waschlösung ist bei 2-8 °C 2 Wochen lang mit Klebefilm bedeckt, um Verunreinigungen zu vermeiden.

**4. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL (NICHT MITGELIEFERT):**

- Schutz für Arbeitstischoberflächen durch Saugpapier, um die Wirkung verschütteter radioaktiver Substanzen zu reduzieren.
- Geeignet gekennzeichnete und konzipierte Abfallbehälter für feste oder flüssige radioaktive Materialien.
- Manuelle oder automatisierte Präzisions-Mikropipetten zum Pipettieren von Proben oder Reagenzien ohne Kreuzkontamination.
- Saugpapier.
- Vakuumpumpe, verbunden über eine Falle, zum Absaugen.
- Horizontaler Schüttler (max. 300 Upm).
- Gammazintillationszähler.

**5. METHODIK:**

**5.1. Gewinnung und Handhabung von Blutproben:**

Die Blutprobe kann in ein trockenes oder ein Antikoagulans enthaltendes Röhrchen eingebracht werden. Wenn Heparin verwendet wird, sollte nur das erforderliche Minimum zugesetzt werden, um Gerinnung zu verhindern.

Nach der Trennung von den roten Blutkörperchen können Plasma- oder Serumproben sofort getestet werden, bei Lagerung bei 2 - 8°C innerhalb von 24 Stunden oder bei Lagerung bei -20°C noch später, nach einem Zeitraum von bis zu mehreren Monaten. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen ist zu vermeiden.

**5.2. Testdurchführung:**

Bei 2 - 8°C gelagerte Reagenzien müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht werden. Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen nicht vermischen. Röhrchen für T („Total Counts – Gesamt“ keine beschichteten Röhrchen verwenden), Kalibratoren, Proben und Kontrollseren beschriften.

Assay doppelt ausführen. Kalibratoren, Kontrollen und Proben müssen zugleich getestet werden.

**1. Kalibratorkurve:**

100  $\mu\text{l}$  jedes Kalibrators in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.

**2. Unbekannte und Kontrollen:**

100  $\mu\text{l}$  jeder Probe oder jedes Kontrollen in die entsprechenden Röhrchen pipettieren.

3. 400  $\mu\text{l}$   ${}^{125}\text{I}$  - ÖSTRON Tracer in jedes Röhrchen zupipettieren.

4. Vortexen, abdecken und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem horizontalen Schüttler (max. 300 Upm) inkubieren.

5. Die Lösung aus allen Röhrchen (außer Röhrchen T) vorsichtig absaugen oder dekantrieren.

6. 2 ml Waschlösung in jedes Röhrchen zupipettieren. Sorgfältig absaugen oder dekantrieren (außer Röhrchen T).

7. Schritt 6 wiederholen.

8. In jedem Röhrchen fixierte Radioaktivität mindestens 60 Sekunden zählen.

**5.3. Datenverarbeitung:**

Mittlere Zählrate für jedes Röhrchenpaar bestimmen.

Verhältnis B/B0 folgendermaßen bestimmen:

$$B/B0 \% = [\text{Kalibrator oder Prb cpm} / B0 (\text{Kalibrator 0}) \text{ cpm}] \times 100$$

Kalibratorkurve zeichnen, indem das für jeden Kalibrator erhaltene Verhältnis B/B0 % (linear) gegenüber seiner jeweiligen in pg/ml ausgedrückten Konzentration (logarithmisch) aufgetragen wird. ÖSTRON-Konzentrationen in den Proben können direkt aus der Kalibratorkurve abgelesen werden.

Wenn zur Berechnung der Resultate ein Computer verwendet wird, können die Daten in die geeignete Gleichung eingebracht werden: gewichtete 4 PL.

#### 5.4. Beispiel eines typischen Assay:

	Inhalt (pg/ml)	cpm 1. Duplikat	cpm 2. Duplikat	Mittlere Zählrate	B/Bo (%)	Östron (pg/ml)
Gesamt	-	50158	50055	50107	-	-
Kal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Kal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Kal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Kal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Kal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Kal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 niedrig	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 hoch	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Probe 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Probe 2	-	8490	8512	8501	56.5	149.1

Beispiel eines typischen Assay, nicht für Berechnungen verwenden.

#### 6.LEISTUNGSMERKMALE:

##### 6.1. Spezifität:

Steroid	% Kreuzreaktivität
Östron	100,00
Östradiol	0,03
Östriol	0,005
DHEA-S	0,0003
Androstendion	N.D.
Progesteron	N.D.
Testosteron	N.D.
Östron-Sulfat	N.D.
17 OH Progesteron	N.D.

##### 6.2. Untere Nachweisgrenze von ÖSTRON:

Die untere Nachweisgrenze beträgt 3,2 pg/ml und entspricht der Konzentration von zwei Standardabweichungen unter dem cpm-Mittelwert von 20 Replikationsbestimmungen der Nullkalibratoren.

##### 6.3. Wiederfindungstest:

Wenn bei Seren mit bekanntem ÖSTRON-Gehalt zum eigenen ÖSTRON anderes ÖSTRON zugesetzt wird, wird eine zufriedenstellende Korrelation zwischen zugesetztem und getestetem ÖSTRON erreicht.

Zugesetztes E1 (pg/ml)	0	25	125
Getestetes E1 (pg/ml)	92,8	57,3	115,3
% Wiederfindung	-	97,3	106

##### 6.4. Verdünnungstest:

Der Verdünnungstest gibt an, dass es immunologische Identität zwischen dem in der Probe anwesenden ÖSTRON und dem zur Kalibrierung der Kalibratorkurve verwendeten ÖSTRON gibt.

Verdünnungsfaktor	1	1/2	1/4	1/8
Getestetes E1 (pg/ml)	179,1	87,2	44,4	23,4
Erwartetes E1 (pg/ml)	-	89,6	44,8	22,4
% Wiederfindung	-	97,3	99	104,5

##### 6.5. Vergleichspräzision:

	Mittelwert (pg/ml)	Intra-Assay-Variation (% CV) 10 Wiederholungen	Inter-Assay-Variation (% CV) 5 getrennte Assays in Duplicat
Pool 1	27.03	5.0	10.55
Pool 2	114.02	3.0	6.29
Pool 3	227.2	10.9	8.89

#### 7.GRENZEN DES VERFAHRENS:

- Die durch diesen oder jeden anderen diagnostischen Testkit erhaltenen Resultate sollten nur im Kontext eines klinischen Gesamtbildes verwendet und interpretiert werden.
- Keine lipämischen, hämolytischen, ikterischen oder getrübten Proben verwenden.

#### 8.ERWARTETE WERTE:

Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen Referenzwerte erstellt.

	Östron (pg/ml)
Männer	10 – 60
Frauen	Follikelphase 50 – 100
	Lutealphase 100 – 300
	Menopause ND - 60

#### 9.VORSICHTSMASSNAHMEN UND WARNUNGEN:

##### Nur zur Verwendung in der IN VITRO DIAGNOSE!

##### VORSICHT: Radioaktives Material

Dieser Kit enthält 125I (Halbwertzeit: 60 Tagen), das ionisierende X (28 keV) und y (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 Laborausrüstung und die Glasbehälter, die mit radioaktiven Substanzen kontaminiert werden können, müssen ausgesondert 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.

Bitte rauchen, trinken, essen Sie nicht in Ihrem Arbeitsbereich, und verwenden Sie keine Kosmetika. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Verwenden Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

##### WARNUNG: Natriumazid

Einige Komponenten enthalten Natriumazid als Konservierungsmittel ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Reagenzien durch Spülen mit reichlich Wasser über die Kanalisation entsorgen.

##### WARNUNG: Potenziell infektiöses Material

Gehen Sie mit allen Komponenten (und allen Patientenproben) so um, als ob sie virale Erkrankungen wie Hepatitis B und C und AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) übertragen könnten.

Ausgangsmaterial aus menschlichen Körperflüssigkeiten oder Organen, die bei der Vorbereitung dieses Kits verwendet wurden, wurden getestet und für HBsAg und Anti-HCV durch Immunoassay für negativ befunden. Kein bekannter Test kann jedoch garantieren, dass solches Material nicht den Erreger viraler Hepatitis enthält.

Ebenso wurden alle Materialien menschlichen Ursprungs, die bei der Vorbereitung dieses Kits verwendet wurden, durch Enzym-Immunoassay auf die Anwesenheit von Antikörpern gegen HIV-1 und -2 getestet und für negativ befunden. Die Abwesenheit dieses Antikörpers kann jedoch nicht die Abwesenheit des viralen Erregers garantieren, der für AIDS verantwortlich ist.

#### 10. LITERATUR:

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Canez MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Fairman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Test radioimmunologico per la determinazione quantitativa di Estrone nel siero o plasma umano

KIPI9100

**USO DIAGNOSTICO IN VITRO**

it

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1.USO PREVISTO:** Per la determinazione IN VITRO dei livelli di ESTRONE presenti nel siero o nel plasma.

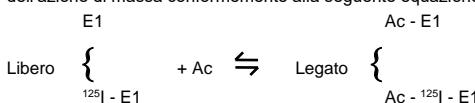
L'origine degli estrogeni plasmatici nelle donne è stata ben studiata attraverso perfezionate tecniche di diluizione isotopica.

In donne normali, la maggior parte dell'estriadiolo plasmatico viene prodotto dalle ovaie, dove le cellule tecali seceranno androstenedione, che viene poi convertito dalle cellule della granulosa, prima in estrone e poi in estradiolo.

Una piccola quantità di estrone viene comunque prodotta e secreta dalle ovaie stesse: la maggior parte deriva dalla conversione periferica dell'estriadiolo e dall'aromatizzazione dell'androstenedione, una reazione catalitica che avviene essenzialmente nel tessuto adiposo. Nelle donne in stato di premenopausa, l'androstenedione viene secreto dalle ovaie e dalle ghiandole surrenali. Nelle donne gravide, la ghiandola surrenale fetale fornisce un significativo contributo alla produzione di androstenedione. Nelle donne in menopausa, l'estrone ottenuto dalla conversione dell'androstenedione surrenale rappresenta l'estrogeno essenziale presente in circolo. Un aumento nella produzione di estrogeni si verifica con il progredire dell'età e in rapporto alla quantità di tessuto adiposo. Gli effetti estrogenici dell'estrone nelle donne in menopausa possono indurre iperplasia dell'endometrio e sanguinamento, ma contribuiscono anche alla preservazione del contenuto di minerali nelle ossa. Nelle donne in premenopausa, livelli elevati di estrone nel sangue possono dipendere dalla conversione di grandi quantitativi di androstenedione prodotti in caso di sindrome ovarica micropolicistica e di tumori ovarici. In tali donne, livelli elevati di estrone nel sangue possono contribuire ad alterare il ciclo mestruale.

L'estrone in circolo si trova essenzialmente legato all'albumina. Questo è un fattore importante nell'interpretazione dei dati relativi al test dell'estrone. Al contrario dell'estriadiolo, i livelli totali di estrone non risultano significativamente modificati dalla concentrazione di SHBG.

**2.PRINCIPIO DEL METODO:** L'ESTRONE (E1) RIA CT obbedisce alla legge dell'azione di massa conformemente alla seguente equazione :



Dal momento che le concentrazioni di  $^{125}\text{I} - \text{E1}$  e degli anticorpi rivestiti risultano costanti, l'andamento dell'equazione dipende dalla concentrazione di E1. La quantità di  $^{125}\text{I} - \text{E1}$  legata alla provetta rivestita è inversamente proporzionale alla concentrazione di E1 presente nel campione.

Dopo l'incubazione, la provetta viene lavata per rimuovere  $^{125}\text{I} - \text{E1}$  non legato in eccesso.

La concentrazione dei campioni paziente viene letta da una curva di calibrazione.

**3.MATERIALE IN DOTAZIONE E RELATIVA CONSERVAZIONE:**

Se conservato a 2-8°C, il materiale potrà essere utilizzato fino alla data di scadenza impressa su ciascuna etichetta.

- 3.1. 2 x 48 provette in polistirene (12 x 75 mm) rivestite con anticorpi policlonali anti-estrone.  
Lasciare sempre che le provette rivestite si portino a temperatura ambiente prima di utilizzazione.  
Conservare a 2-8°C le provette inutilizzate.

- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 giallo, 42 ml  
1 flacone di ESTRONE etichettato  $^{125}\text{I}$  in buffer con uno stabilizzante, un conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) e un colorante giallo.  
Ogni flacone contiene meno di 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ )

- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 1 ml in ogni fiala ad eccezione del calibratore 0: 2 ml  
 $N = 0 \text{ a } 5$   
6 fiale di ESTRONE in siero contenenti conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ).  
Le concentrazioni sono stampate sull'etichetta delle fiale.  
Conservare a 2-8°C per max.12 settimane. Per periodi più lunghi, conservare a -20°C.

- 3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 flaconi, liofilizzati - N=1 o 2  
2 fiale di plasma umano contenenti conservanti ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). I controlli sono stati testati insieme ai campioni paziente. I range relativi ai controlli sono impressi sull'etichetta delle fiale.  
Prima dell'uso, ricostituire il contenuto dei controlli con 1 ml di acqua distillata. Dopo la ricostituzione, i controlli sono stabili per 7 giorni a 2-8 °C. Per periodi più lunghi, i controlli devono essere divisi in aliquote e conservati a -20 °C per un massimo di 3 mesi. Evitare i cicli di congelamento / scongelamento.

3.5.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

70 x concentrato, 10 ml

1 flacone di soluzione tamponata concentrata contenente sodio azide ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Versare la soluzione in 700 ml di acqua distillata. La soluzione di lavaggio ricostituita è stabile per 2 settimane a 2-8 °C ricoperta da un film adesivo per evitare la contaminazione

**4.MATERIALI RICHIESTI MA NON IN DOTAZIONE:**

- superfici di banco protette con carta assorbente per ridurre gli effetti in caso di versamento di sostanze radioattive.
- contenitore per smaltimento dei rifiuti appositamente etichettato ed adatto ai materiali radioattivi solidi o liquidi.
- micropipette di precisione manuali o automatiche per l'erogazione di campioni o reagenti senza possibilità di contaminazione crociata.
- carta assorbente.
- pompa a vuoto per aspirazione collegata tramite un sifone intercettatore
- agitatore orizzontale (max. 300 giri al minuto)
- un contatore gamma a scintillazione.

**5.METODOLOGIA:**

5.1. Raccolta e manipolazione dei campioni di sangue:

Il campione di sangue può essere raccolto in una provetta asciutta oppure in una provetta contenente anticoagulante. In caso di utilizzo di eparina, per evitare la coagulazione è necessario aggiungere esclusivamente il quantitativo minimo necessario.

Dopo la separazione dai globuli rossi, sarà possibile testare i campioni di plasma o siero immediatamente, nell'arco delle 24 ore se conservati a 2-8°C oppure dopo molti mesi se conservati a -20°C. È necessario evitare ripetuti congelamenti e scongelamenti.

5.2. Procedimento del test:

Prima dell'uso, portare a temperatura ambiente i reagenti conservati a 2-8°C. Non miscelare reagenti provenienti da lotti diversi. Etichettare le provette dei calibratori T («Conteggi totali» non utilizzare provette rivestite), campioni e sieri di controllo.

Eseguire il test in duplice. Eseguire il test contemporaneamente a calibratori, controlli e campioni.

1. Curva di calibrazione:

Pipettare 100  $\mu\text{l}$  di ciascun calibratore nelle provette corrispondenti.

2. controlli e sconosciuti:

Pipettare 100  $\mu\text{l}$  di ciascun campione o dei controlli nelle provette corrispondenti.

3. Aggiungere a ciascuna provetta 400  $\mu\text{l}$  di  $^{125}\text{I}$  - ESTRONE tracciante.

4. Agitare, coprire e incubare per 2 ore a temperatura ambiente su un agitatore orizzontale (max. 300 giri al minuto).

5. Aspirare con cautela o lasciare decantare la soluzione di tutte le provette. (eccetto le provette dei conteggi totali).

6. Aggiungere a ciascuna provetta 2 ml di soluzione di lavaggio. Aspirare (eccetto le provette dei conteggi totali).

7. Ripetere la fase 6.

8. Contare la radioattività fissata in ciascuna provetta per almeno 60 secondi (Cpm = Conta per minuto).

5.3. Elaborazione dei dati:

Determinare l'indice medio di conteggio relativo a ogni serie di provette in duplice. Calcolare il rapporto B/B0 procedendo come segue:

$$B/B0 \% = [ \text{Cpm calibratore o Camp.} / \text{Cpm B0 (Calibratore 0)} ] \times 100$$

Disegnare la curva di calibrazione tracciando il rapporto B/B0 % (scala lineare) ottenuto per ogni raffronto calibratore/rispettiva concentrazione, espresso in pg/ml (scala logaritmica).

Le concentrazioni di ESTRONE nei campioni possono essere lette direttamente dalla curva di calibrazione.

Se si utilizza un computer per calcolare i risultati, i dati potranno essere inseriti alla seguente equazione: peso 4 PL.

**5.4. Esempio di test tipico:**

	Contenuto (pg/ml)	1° cpm duplicato	2° cpm duplicato	Media indice conteggio	B/Bo (%)	Estrone (pg/ml)
Conteggi totali	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 basso	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 alto	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Campione 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Campione 2	-	8490	8512	8501	56.5	149,1

Esempio di test tipico, da non utilizzare per i calcoli

**6. CARATTERISTICHE DI PRESTAZIONE:**

**6.1. Specificità:**

Steroide	% Reattività crociata
Estrone	100.00
Estradiolo	0.03
Estriolo	0.005
DHEA-S	0.0003
Androstanedione	N.D.
Progesterone	N.D.
Testosterone	N.D.
Estrone - solfato	N.D.
17 OH Progesterone	N.D.

**6.2. Concentrazione minima di ESTRONE rilevabile:**

La concentrazione minima rilevabile è stata testata a 3,2 pg/ml e corrisponde alla concentrazione ottenuta da due deviazioni standard inferiori al cpm medio delle 20 determinazioni replicate dei calibratori zero.

**6.3. Test di recupero:**

Quando i sieri dei contenuti di ESTRONE noti presentano un aumento del proprio ESTRONE attraverso l'aggiunta di ESTRONE, si ottiene una correlazione soddisfacente tra l'ESTRONE aggiunto e quello testato.

E1 aggiunto (pg/ml)	0	25	125
E1 testato (pg/ml)	92.8	57.3	115.3
% recupero	-	97.3	106

**6.4. Test di diluizione:**

Il test di diluizione indica la presenza di identità immunologica tra l'ESTRONE presente nel campione e l'ESTRONE utilizzato per calibrare la curva di calibrazione.

Fattore di diluizione	1	1/2	1/8	1/16
E1 testato (pg/ml)	179.1	87.2	44.4	23.4
E1 atteso (pg/ml)	-	89.6	44.8	22.4
% recupero	-	97.3	99	104.5

**6.5. Riproducibilità:**

	Valore medio (pg/ml)	Variabilità intra saggio (%CV) 10 repliche	Variabilità inter saggio (%CV) 5 test separati in duplice
Gruppo 1	27.03	5.0	10.55
Gruppo 2	114.02	3.0	6.29
Gruppo 3	227.2	10.9	8.89

**7. LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA:**

- Utilizzare e interpretare i risultati ottenuti con questo o con qualsiasi altro kit diagnostico esclusivamente nell'ambito di un quadro clinico generale.
- Non utilizzare campioni lipemici, emolizzati, itterici o torbidi.

**8. VALORI ATTESI:**

Si consiglia a ciascun laboratorio di stabilire i propri valori di riferimento.

	Estrone (pg/ml)
Maschi	10 – 60
Femmine	
Fase follicolare	50 – 100
Fase luteale	100 – 300
Menopausa	ND - 60

**9. AVVERTENZE E PRECAUZIONI:**

**Solo per uso DIAGNOSTICO IN VITRO**

**ATTENZIONE: Materiale radioattivo**

Il kit contiene  $^{125}\text{I}$  (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizzanti

L'acquisto, a 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.

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.

**AVVERTENZA: Sodio azide**

Alcuni componenti contengono sodio azide come agente conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Smaltire i reagenti attraverso il sistema idraulico risciacquando abbondantemente con acqua corrente.

**AVVERTENZA: Materiali potenzialmente infettivi**

Maneggiare tutti i componenti (e tutti i campioni paziente) alla stregua di sostanze in grado di trasmettere malattie quali epatite B e C e sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS).

Il materiale di origine ottenuto da liquidi corporei umani o da organi utilizzato per la preparazione del presente kit è stato testato ed è risultato, a seguito di test immunologico, negativo all'HbsAg e anti-HCV. Ciononostante nessun test noto è in grado di escludere completamente l'assenza da detti materiali di agenti in grado di provocare epatite virale.

Allo stesso modo tutti i materiali umani utilizzati nella preparazione del presente kit, sono stati analizzati, tramite test immunoenzimatico, per rilevare la presenza di anticorpi anti HIV 1 e HIV 2 e sono risultati negativi. Ciononostante, l'assenza di questo anticorpo non è in grado di garantire la completa assenza di agenti virali responsabili della sindrome da immunodeficienza acquisita.

**10. BIBLIOGRAFIA:**

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Canez MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Faiman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 - 483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

**Radioinmunoensayo para la determinación cuantitativa de la Estrona en  
Suero o plasma Humano  
KIP19100  
USO DIAGNÓSTICO IN VITRO**

**es**

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1.USO :** Para la determinación **IN VITRO** de los niveles de ESTRONA en suero o plasma.

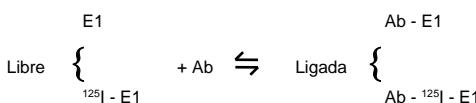
El origen de los estrógenos plasmáticos en las mujeres ha sido detalladamente estudiado con refinadas técnicas de dilución isotópica.

En mujeres normales la mayor parte del estradiol plasmático proviene de los ovarios, donde las células tecales secretan androstenediona, que se convierte en estrona y luego en estradiol por medio de las células granulosas.

De hecho muy poca estrona es sintetizada y secretada por el ovario: la mayor parte se genera por conversión periférica de estradiol y de la aromatización de la androstenediona, una reacción catalítica realizada principalmente en el tejido adiposo. En mujeres pre menopáusicas la androstenediona es secretada por los ovarios y las suprarrenales. En mujeres embarazadas las glándulas suprarrenales del feto aportan significativamente a la producción de androstenediona. En mujeres menopáusicas, la estrona es el estrógeno esencial encontrado en circulación, resultando de la conversión de androstenediona suprarrenal. Con la edad se produce un aumento en la formación de estrógeno y va en relación a la cantidad de tejido adiposo. Los efectos estrogénicos de la estrona en mujeres menopáusicas pueden producir hiperplasia del endometrio y sangraimiento pero también mantienen el contenido mineral de los huesos. En mujeres pre menopáusicas niveles sanguíneos excesivos de estrona pueden resultar de la conversión de grandes cantidades de androstenediona producida en el síndrome de ovario micro poliquístico y tumores ováricos. En estas mujeres, niveles sanguíneos altos de estrona pueden tener que ver con problemas del ciclo menstrual.

La estrona en circulación va principalmente unida a albúmina. Esto es importante al interpretar los datos del ensayo de estrona. De hecho, y al contrario del estradiol, los niveles totales de estrona no son significativamente alterados por la concentración de SHBG.

**2.PRINCIPIOS DEL MÉTODO:** El ESTRONE (E1) CT RIA obedece al principio de la acción de masa según la siguiente ecuación :



Visto que las concentraciones de la  ${}^{125}\text{I}$  - E1 y de los anticuerpos recubiertos son constantes, la evolución de la ecuación depende de la concentración de E1. La cantidad de  ${}^{125}\text{I}$  - E1 ligada al tubo recubierto es inversamente proporcional a la concentración de E1 en la muestra.

Después de la incubación, el tubo es lavado para quitar la  ${}^{125}\text{I}$  - E1 no ligada. Las concentraciones de las muestras de los pacientes se leen de una curva de calibración

## 3. MATERIAL SUMINISTRADO Y PRESERVACIÓN:

Guardado a 2 - 8°C, el material puede ser utilizado hasta la fecha de caducidad indicada en cada etiqueta

3.1. 2 x 48 tubos de polipropileno (12 x 75 mm) recubiertos con anticuerpos policlonales anti-Estrona.  
Permitir sistemáticamente que los tubos recubiertos alcancen temperatura ambiente antes de su empleo  
Guarde los tubos no usados entre 2-8°C.

3.2. amarillo, 42 ml  
1 botella de ESTRONA marcada con  ${}^{125}\text{I}$  en tampon con un estabilizador, un preservativo ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) y un colorante amarillo.  
Cada botella contiene menos de 185 Kbp (5  $\mu\text{Ci}$ )

3.3. 1 ml en cada pomo excepto el Calibrador 0 : 2 ml  
 $N = 0$  a 5  
6 pomos de ESTRONA en suero conteniendo un preservativo ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Las concentraciones están indicadas en las etiquetas. Almacene entre 2-8°C por un máximo de 12 semanas. Para períodos más largos almacene a -20°C.

3.4. 2 viales, liofilizados -  $N = 1$  o 2  
2 pomos de plasma humano conteniendo un preservativo ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Los controles deben ser probados al mismo tiempo que las muestras de los pacientes. Los alcances para los controles están indicados en las etiquetas de los pomos.  
Antes de usar, reconstituya el contenido de los controles con 1 ml de agua destilada. Después de la reconstitución, los controles se mantienen estables durante 7 días a 2-8°C. Para períodos más largos, los controles deben ser divididos en aliquotas y mantenerse a -20°C durante un máximo de 3 meses. Evitar los ciclos de congelación / descongelación.

3.5. concentrado x 70, 10 ml  
1 botella de solución tamponada concentrada con azida de sodio ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Vacíe la solución en 700 ml de agua destilada. La solución de lavado reconstituida es estable durante 2 semanas a 2-8°C cubierta con una película adhesiva para evitar la contaminación.

## 4. MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO :

- Superficies de banco, protegidas por papel secante para reducir los efectos del excedente radiactivo.
- Contenedores de residuos, marcados convenientemente y diseñados para materiales radiactivos sólidos o líquidos.
- Micropipetas manuales o automáticas para dispensar las muestras o los reactivos sin contaminación cruzada.
- Papel secante.
- Bomba de vacío, vinculada por una válvula, para la aspiración
- Agitador reciprocante u orbital (max. 300 rpm).
- Un contador de radiaciones gama.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Colección y manejo de las muestras de sangre :

La muestra de sangre puede ser coleccionada en un tubo seco o uno que contenga un anticoagulante. Si se usa heparina se debe agregar solo el mínimo necesario para evitar coagulación.

Después de la separación de los glóbulos rojos, las muestras de suero o plasma pueden ser probadas inmediatamente, en 24 horas si se guardan a 2 - 8°C, o más tarde, después de un período de unos meses se guardan a -20°C. Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

### 5.2. Procedimiento del ensayo :

Los reactivos guardados a 2°- 8° C. deben estar a temperatura ambiente antes del uso. No mezclar reactivos de series diferentes. Marcar los tubos para T (« Cuentas Totales » no utilizar tubos recubiertos) calibradores, muestras y controles. Los calibradores y controles deben ser mezclados antes del uso por inversión o rotación ; no vortexear.

Hacer el ensayo en duplicado. Calibradores, controles y muestras deben ser probados a la misma hora.

#### 1. Curva de calibración :

Pipetejar 100  $\mu\text{l}$  de cada calibrador en los tubos apropiados.

#### 2. Muestras y controles :

Pipetejar 100  $\mu\text{l}$  de cada muestra o controles en los tubos apropiados.

3. Añadir 400  $\mu\text{l}$  de trazador de  ${}^{125}\text{I}$  - ESTRONA a cada tubo.

4. Agite en vortex, cubra e incube por 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal (max. 300rpm).

5. Cuidadosamente aspirar o decantar la solución de cada tubo. (Excepto los tubos de conteos totales).

6. Añadir 2 ml de solución de lavado a cada tubo. Aspirar o decantar cuidadosamente. (Excepto los tubos de conteos totales)..

7. Repita el paso 6.

8. Contar la radioactividad fijada en cada tubo durante al menos 60 segundos.

#### 5.3. Data processing:

##### Procesamiento de los datos :

Determinar la proporción de recuento media para cada juego de tubos en duplicado. Calcular la razón B/B0 según :

$$B/B0 \% = [ \text{Calibrador o Smp cpm} / B0 (\text{Calibrador 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Dibujar la curva de calibración trazando la razón B/B0 % (escala lineal) obtenida para cada calibrador versus su concentración correspondiente expresada en pg/ml (escala logarítmica). Las concentraciones de ESTRONA en las muestras se pueden leer directamente de la curva de calibración.

Si se utiliza un ordenador para calcular los resultados, los datos pueden ser utilizados en la ecuación apropiada: 4 Parámetros

#### 5.4. . Ejemplo de un ensayo típico:

	Contenido s (pg/ml)	cpm 1 duplicado	cpm 2 duplicado	Proporción de recuento media	B/Bo (%)	Estrona (pg/ml)
Cuentas totales	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 bajo	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 elevado	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Muestra 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Muestra 2	-	8490	8512	8501	56.5	149,1

Ejemplo de un ensayo típico, no utilizar para cálculos

#### 6. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO:

##### 6.1. Especificidad

Esteroides	% Reactividad cruzada
Estrona	100,00
Estradiol	0,03
Estriol	0,005
DHEA-S	0,0003
Androstenediona	N.D.
Progesterona	N.D.
Testosterona	N.D.
Estrona - Sulfato	N.D.
17 OH Progesterona	N.D.

##### 6.2. Concentración mínima detectable de TESTOSTERONA LIBRE :

La concentración mínima detectable ha sido probada a 3,2 pg/ml y corresponde a la concentración obtenida de dos desviaciones estándar debajo del cpm medio de 20 determinaciones replicadas del calibrador.

##### 6.3. Prueba de Recuperación:

Cuando sueros con concentraciones conocidas de ESTRONA se suplementan agregándoles ESTRONA, se obtiene una buena correlación entre la ESTRONA agregada y la detectada en el ensayo.

E1 añadido (pg/ml)	0	25	125
Detecteda E1 (pg/ml)	92,8	57,3	115,3
% Recuperado	-	97,3	106

##### 6.4. Prueba de dilución :

La prueba de dilución indica que hay identidad inmunológica entre la ESTRONA presente en la muestra y la ESTRONA usada para producir la curva de calibración.

Factor de dilución	1	1/2	1/4	1/8
Detecteda E1 (pg/ml)	179,1	87,2	44,4	23,4
Esperada E1 (pg/ml)	-	89,6	44,8	22,4
% Recuperado	-	97,3	99	104,5

##### 6.5. . Reproducibilidad:

	Valor medio (pg/ml)	Dentro de la variación del ensayo (% CV) 10 réplicas	Entre la variación del ensayo (% CV) 5 ensayos separados en duplicado
Serie 1	27,03	5,0	10,55
Serie 2	114,02	3,0	6,29
Serie 3	227,2	10,9	8,89

#### 7. LIMITACIÓN DEL PROCEDIMIENTO

7.1. Los resultados obtenidos de este u otro ensayo diagnóstico deben ser utilizados e interpretados solamente en el contexto de una vista clínica general.

7.2. No utilizar especímenes lipémicos, hemolizados, ictericos o turbios.

#### 8. VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

	Estrona (pg/ml)
Hombres	10 - 60
Mujeres	
Fase folicular	50 - 100
Fase lútea	100 - 300
Menopáusia	ND - 60

#### 9. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

##### Para uso solo en diagnóstico IN VITRO

##### ADVERTENCIA : material radiactivo

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

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.

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

##### ADVERTENCIA : Azida sódica

Unos componentes contienen azida sódica como preservativo ( $NaN_3 < 0,1\%$ ). Tirar los reactivos con abundante agua en el alcantarillado.

##### ADVERTENCIA : Material potencialmente infeccioso

Manejar cada componente del ensayo (y cada muestra de paciente) como transmisor potencial de enfermedades virales como hepatitis B y C y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

Los componentes derivados de fluidos u órganos humanos utilizados en la preparación de este ensayo han sido probados por inmunoensayo dando negativo a HBsAg y anti-HCV. Sin embargo, no se conoce ningún método que asegure que este material no contiene la causa de hepatitis viral.

Asimismo, cada componente humano utilizado en la preparación de este ensayo ha sido probado por inmunoensayo enzimático dando negativo a la presencia de anticuerpos anti-HIV-1 y -2. No obstante, la ausencia de este anticuerpo no puede garantizar la ausencia de un componente viral responsable del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

#### 10. BIBLIOGRAFIA

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Canez MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Fairman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Radioimunoensaio para Determinação Quantitativa de Estrona em Soro ou Plasma Humano

KIPI9100

pt

SOMENTE PARA DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1. INTENÇÃO DE USO:

Para determinação in vitro dos níveis de ESTRONA no soro ou plasma

A origem de estrógenos plasmáticos em mulheres tem sido precisamente estudada por refinadas técnicas de diluição isotópica.

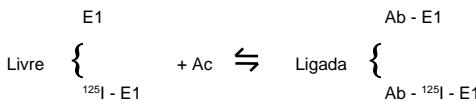
Em mulheres normais, a maioria do estradiol plasmático é obtido a partir do ovário, em que as células da teca secretam androstenediona, que é então convertido em estrona e no estradiol pelas células granulosas.

Pouca estrona é de fato formado e secretado pelo ovário, a maior parte tem origem a partir de uma conversão periférica de estradiol e da aromatização de androstenediona, a reação catalítica realizada essencialmente no tecido adiposo. Em mulheres pré-menopausa, a androstenediona é secretada pelo ovário e suprarrenais. Em mulheres grávidas, a glândula adrenal fetal fornece uma contribuição significativa para a produção de androstenediona. Em mulheres na menopausa, a estrona é o estrógeno essencial, encontrado na circulação, que é resultado da conversão de androstenediona adrenal. Um aumento na formação de estrógeno ocorre com o envelhecimento e em correlação com a quantidade de tecido adiposo. Os efeitos estrogênicos da estrona em mulheres na menopausa podem produzir hiperplasia endometrial e sangramento, mas também mantém o conteúdo mineral ósseo. Em mulheres pré-menopausa, os níveis sanguíneos de estrona excessivas podem resultar na transformação de uma grande quantidade de androstenediona produzidos em micropolíticos síndrome do ovário e tumores do ovário. Nestas mulheres, níveis sanguíneos elevados de estrona pode influenciar numa perturbação do ciclo menstrual.

A estrona na circulação está essencialmente ligado à albumina. Isto é importante para a interpretação dos dados do ensaio-estrôna. Na verdade, e ao contrário do estradiol estrôna totais não são modificadas significativamente pela concentração de SHBG.

## 2. PRINCÍPIO DO MÉTODO:

O ESTRONE-RIA-CT obedece à lei da ação da massa atuando de acordo com a equação a seguir :



Desde que as concentrações de  ${}^{125}\text{I}$  - E1 e anticorpos adsorvidos são constantes, o estado de progresso da equação depende da concentração de E1. A quantidade de  ${}^{125}\text{I}$  - E1 ligado ao tubo adsorvido é inversamente proporcional à concentração de E1 na amostra.

Após a incubação, o tubo é lavado para remover o excesso de E1  ${}^{125}\text{I}$  - não ligado. Concentração das amostras de pacientes são lidas na curva de calibração.

## 3. MATERIAL FORNECIDO E ESTOCAGEM:

Estocado à 2 - 8°C, o material pode ser usado até o prazo de validade impresso em cada etiqueta.

3.1. 2 x 48 Tubos de Polistireno (12 x 75 mm) adsorvidos com anticorpos policlonais anti-Estrona.  
Permita que os tubos adsorvidos alcancem a temperatura ambiente antes do uso.  
Estoque os tubos não utilizados a 2-8°C.

3.2. Ag  ${}^{125}\text{I}$  amarelo, 42 ml  
1 frasco de  ${}^{125}\text{I}$ -marcado ESTRONA em tampão com um estabilizador, um conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) e um corante amarelo. Cada frasco contém menos de 185 kBq (5  $\mu\text{Ci}$ )

3.3. CAL N 1 ml em cada frasco, exceto para o calibrador 0: 2 ml  
 $N = 0-5$   
6 frascos da estrona no soro contendo conservante  $\text{NaN}_3 (< 0,1\%)$ . As concentrações estão impressas nos rótulos dos frascos. Armazenar a 2-8°C durante até 12 semanas. Para períodos mais longos, estoque a -20°C.

3.4. CONTROL N 2 frascos, liofilizados -  $N = 1$  ou 2  
2 frascos de plasma humano contendo conservantes  $\text{NaN}_3 (< 0,1\%)$ . Os controles devem ser testados juntamente com as amostras dos pacientes. Os intervalos para os controles estão impressos nos rótulos dos frascos.  
Antes do uso, reconstitua os conteúdos dos controles com 1 ml de água destilada. Após reconstituição, os controles permanecem estáveis durante 7 dias a 2-8 ° C. Por períodos mais longos, os controles devem ser aliquotados e mantidos a -20 ° C por no máximo 3 meses. Evite ciclos de congelamento / descongelamento.

3.5.

WASH SOLN CONC

70 x concentrado, 10 ml

1 frasco de solução tampão concentrado contendo azida sodica ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Coloque a solução em 700 ml de água destilada. A solução de lavagem reconstituída é estável durante 2 semanas a 2-8 ° C coberta com película adesiva para evitar a contaminação.

## 4. MATERIAL REQUERIDO MAS NÃO FORNECIDO:

- bancada, protegida por papel absorvente para reduzir os efeitos da contaminação pela radioatividade.
- containers para descarte do lixo, apropriadamente marcado e apropriado para materiais radioativos líquidos e sólidos.
- micropipetas manuais ou automáticas para dispensar amostras ou reagentes sem contaminação cruzada.
- papel absorvente.
- bomba de vácuo, para aspiração.
- agitador horizontal (máx 300 rpm)
- contador de cintilação gamma

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Coleta e manuseio das amostras de sangue:

A amostra de sangue pode ser coletada dentro de um tubo seco ou um que contenha um anticoagulante. Se a heparina é utilizada, apenas o mínimo requerido deve ser adicionado para evitar a coagulação.

Após separação das células vermelhas, plasma ou as amostras de soro podem ser analisadas imediatamente, dentro de 24 horas se estocadas à 2 - 8°C, ou mais tarde, após um período superior a alguns meses, se estocadas à -20°C. Deve-se evitar repetidos descongelamentos e congelações.

### 5.2 Procedimento do ensaio:

Reagentes estocados à 2 - 8°C devem ser colocados à temperatura ambiente antes do uso. Não misture reagentes de diferentes lotes. Marque os tubos para T (« ContagemTotal » não use tubos recobertos) calibradores, amostras e controles.

Realize o ensaio em duplicata. Calibradores, controles e amostras devem ser analisados ao mesmo tempo.

#### 1. Curva calibradora:

Pipete 100  $\mu\text{l}$  de cada calibrador dentro dos tubos correspondentes.

#### 2. Desconhecidos e controles:

Pipete 100  $\mu\text{l}$  de cada amostra ou controles dentro dos tubos correspondentes.

3. Adicione 400  $\mu\text{l}$  de marcador  ${}^{125}\text{I}$  - ESTRONA para cada tubo.

4. Vortex, cubra e incube por 2 horas à temperatura ambiente num agitador horizontal (máx. 300 rpm).

5. Cuidadosamente aspire ou decante a solução de todos os tubos. (Exceto tubos de contagem total).

6. Adicione 2 ml de solução de lavagem em cada tubo. Aspire ou decante cuidadosamente. (Exceto tubos de contagem total).

7. Repita o passo 6.

8. Conte a radioatividade fixada em cada tubo por pelo menos 60 segundos.

### 5.3 Processando os dados:

Calcule a proporção B/B0 como a seguir :

$$B/B0 \% = [ \text{Calibrador ou Amostra cpm} / B0 (\text{Calibrador 0}) \text{ cpm}] \times 100$$

Desenhe a curva calibradora plotando a proporção B/B0 % (escala linear) obtida de cada calibrador versus sua respectiva concentração expressada em pg/ml (escala logarítmica). Concentração de ESTRONA nas amostras podem ser lidas diretamente da curva calibradora.

Se o computador é usado para calcular os resultados, os dados devem ser ajustados para equação apropriada : pesava 4 PL.

**5.4. Exemplo de um ensaio típico:**

	Conteúdo (pg/ml)	cpm 1st duplicata	cpm 2nd duplicata	Média cpm	B/Bo (%)	Estrona (pg/ml)
Contagem Total	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 baixo	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 alto	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Amostra 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Amostra 2	-	8490	8512	8501	56.5	149,1

Exemplo de ensaio típico, não use para cálculos

**6. PERFORMANCE CARACTERÍSTICAS:**

**6.1. Especificidade**

Esteróide	% Reação-cruzada
Estrona	100,00
Estradiol	0,03
Estriol	0,005
DHEA-S	0,0003
Androstenediona	N.D.
Progesterona	N.D.
Testosterona	N.D.
Estrona - Sulfato	N.D.
17 OH Progesterona	N.D.

**6.2 Concentração mínima detectável de ESTRONA**

Concentração mínima detectável tem sido analisada a 3,2 pg/ml e corresponde a concentração dada por dois desvios padrões abaixo da média com 20 determinações replicadas do calibrador zero.

**6.3 Teste de Recuperação:**

Quando soros contendo uma quantidade conhecida de ESTRONA recebem adição de ESTRONA, uma correlação satisfatória entre ESTRONA teórico e analisado é obtido.

Adicionado E1 (pg/ml)	0	25	125
Analizado E1 (pg/ml)	92,8	57,3	115,3
% recuperação	-	97,3	106

**6.4 Teste de diluição :**

O teste de diluição indica se há identidade imunológica entre ESTRONA presente na amostra e o ESTRONA usado para calibrar o teste.

Fator de diluição	1	1/2	1/4	1/8
Teoricamente E1 (pg/ml)	179,1	87,2	44,4	23,4
Analizado E1 (pg/ml)	-	89,6	44,8	22,4
% recuperação	-	97,3	99	104,5

**6.5. Reprodutibilidade:**

	Média (pg/ml)	Variação dentro do ensaio (% CV) 10 replicatas	Variação entre os ensaios (% CV) 5 Ensaios separados em duplo
Pool 1	27,03	5,0	10,55
Pool 2	114,02	3,0	6,29
Pool 3	227,2	10,9	8,89

**7. LIMITAÇÃO DO PROCEDIMENTO**

7.1 Os resultados obtidos deste ou de outro kit de diagnóstico devem ser usados e interpretados somente dentro do contexto de um quadro clínico.

7.2 Não use amostras lipêmicas, hemolizadas, ictericas ou turvas.

**8. VALORES ESPERADOS**

É recomendado que cada laboratório estabeleça os seus próprios valores de referência.

	Estrona (pg/ml)
Homens	10 - 60
Mulheres	
Fase folicular	50 - 100
Fase lutea	100 - 300
Menopausa	ND - 60

**9. CUIDADOS E PRECAUÇÕES**

**Somente para diagnóstico IN VITRO**

**CUIDADO : Material radioativo**

Este kit contém  $^{125}\text{I}$  (meia-vida: 60 dias), emitindo radiações X (28 keV) e  $\gamma$  (35,5 keV) ionizantes. Este produto radioativo pode apenas ser transportado e utilizado por pessoal autorizado: a compra, armazenamento, utilização e troca de produtos radioativos estão sujeitas à legislação nacional vigente. Em nenhum caso, este produto pode ser administrados a seres humanos ou a animais.

Toda a manipulação radioactiva deve ser efectuada em local próprio e exclusivo para tal. Deve ser mantido no laboratório, um livro de registo para a recepção e armazenamento de material radioativo. O equipamento do laboratório e equipamento de vidro que possa ser contaminado com radioactividade, deve ser segregado para evitar contaminação cruzada com diferentes isótopos. Qualquer derrame de material radioactivo deve ser imediatamente limpo, de acordo com os procedimentos de radioprotecção. O lixo radioativo deve ser rejeitado de acordo com a legislação vigente e as regras do laboratório. A adesão às regras básicas da segurança com radioactividade, fornece a protecção adequada.

Não pipete com o auxilio da boca. Use vestuário adequado de protecção e luvas.

**AVISO: Azida sódica**

Alguns componentes contêm azida sódica como conservante ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Descarte os reagentes através de lavagem com grande quantidade de água através do sistema de encanamento.

**AVISO: material potencialmente infeccioso**

Manuseie todos os componentes (e todas as amostras de paciente) como sendo capazes de transmitir doenças virais como hepatite B e C e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Material derivado de fluidos corporais ou órgãos humanos e usados na preparação deste kit foram testados e considerados negativos para HBsAg e anti-HCV por imunoensaio. No entanto, nenhum teste pode garantir que esse material não contenha o agente causador da hepatite viral.

Da mesma forma, todos os materiais humanos utilizados na preparação deste kit foram rastreados para a presença de anticorpos contra HIV-1 e -2 por imunoensaio enzimático e foram considerados negativos. No entanto, a ausência deste anticorpo não pode garantir a ausência do agente viral responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida.

**10. BIBLIOGRAFIA**

- Yallow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Caney MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Faiman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Ραδιοανοσοπροσδιορισμός για τον ποσοτικό προσδιορισμό της οιστρόνης  
σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα

KIP19100

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ ΧΡΗΣΗ IN VITRO

el

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

**1.ΠΡΟΟΡΙΖΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ:** Για τον IN VITRO προσδιορισμό των επιπέδων της ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ σε ορό ή πλάσμα.

Η προέλευση των οιστρογόνων του πλάσματος στις γυναίκες έχει μελετηθεί διεξοδικά με την εφαρμογή τεχνικών ισοποιητικής αράβασης μεγάλης ακρίβειας.

Στις φυσιολογικές γυναίκες, το μεγαλύτερο ποσοστό της οιστραδιόλης του πλάσματος προέρχεται από τις ωθήκες, όπου τα κύτταρα της θήκης εκκρίνουν ανδροστενεδίονη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε οιστρόνη και κατόπιν σε οιστραδιόλη από τα κοκκιώδη κύτταρα.

Πράγματι, πολύ μικρή ποσότητα οιστρόνης σχηματίζεται και εκκρίνεται από τις ωθήκες: το μεγαλύτερο ποσοστό προέρχεται από μια περιφερική μετατροπή της οιστραδιόλης και από την αρματοποίηση της ανδροστενεδίονης, μια καταλυτική αντιδραση στο ουσιαστικά λαμβάνει χώρα σε λιπωδή ιστό. Στις προεμπνοπαυσιακές γυναίκες, η ανδροστενεδίονη εκκρίνεται από την ωθήκη και τα επινεφρίδια. Στις εγκύους, τα επινεφρίδια του εμβρύου συμβάλλουν σημαντικά στην παραγωγή ανδροστενεδίονης. Στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες, η οιστρόνη είναι το βασικό οιστρόγονο που εντοπίζεται στην κυκλοφορία, η οποία προκύπτει από τη μετατροπή της ανδροστενεδίονης στη επινεφρίδια. Μία αύξηση στην ανάπτυξη των οιστρογόνων λαμβάνει χώρα με τη γήρανση και συσχετίζεται με την ποσότητα του λιπωδούς ιστού.

Οι οιστρογονικές δράσεις της οιστρόνης στις εμμηνοπαυσιακές γυναίκες ενδέχεται προκαλέσουν να υπερπλασία του ενδομητρίου και αιμορραγία, αυτή όμως συμβάλλει και στη διατήρηση των μεταλλικών στοιχείων των οστών.

Στις προεμπνοπαυσιακές γυναίκες, ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα οιστρόνης στο αίμα ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα της μετατροπής μεγάλων ποσοτήτων ανδροστενεδίονης, η οποία παράγεται σε περιπτώσεις συνθήρουσα μικροπολυκυστικών ωθηθών και όγκων των ωθηθών. Σε αυτές τις γυναίκες τα υψηλά επίπεδα οιστρόνης στο αίμα ενδέχεται να συμβάλουν σε μια διαταραχή του έμμηνου κύκλου.

Στην κυκλοφορία η οιστρόνη είναι ουσιαστικά δεσμευμένη στη λευκωματίνη. Το γενογός αυτό είναι σημαντικό για την ερμηνεία των δεδομένων του προσδιορισμού της οιστρόνης. Πράγματι, εν αντιθέσει με την οιστραδιόλη, τα συνολικά επίπεδα της οιστρόνης δεν τροποποιούνται ιδιαίτερα από τη συγκέντρωση της SHBG.

**2.ΒΑΣΙΚΗ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ:** Ο προσδιορισμός οιστρόνης (E1) CT RIA διέπεται από το νόμο δράσης της μάζας σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

E1

Ab - E1

$$\text{Ελεύθερη } \left\{ \begin{array}{l} + \text{Ab.} \\ ^{125}\text{I} - \text{E1} \end{array} \right. \Leftarrow \text{Δεσμευμένη } \left\{ \begin{array}{l} \text{Ab} - ^{125}\text{I} - \text{E1} \end{array} \right.$$

Δεδομένου ότι οι συγκεντρώσεις της σημασμένης με  $^{125}\text{I}$  E1 και των επιστρωμένων αντισωμάτων είναι σταθερές, η κατάσταση προύδου της εξίσωσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση της E1. Η ποσότητα της σημασμένης με  $^{125}\text{I}$  E1, που είναι δεσμευμένη στο επιστρωμένο σωληνάριο, είναι αντιστρόφως ανάλογη προς τη συγκέντρωση της E1 στο δείγμα.

Μετά από την επωαση, το σωληνάριο υποβάλλεται σε πλύση για να αφαιρεθεί η επιπλέον μη δεσμευμένη E1, η οποία είναι σημασμένη με  $^{125}\text{I}$ .

Η ανάγνωση της συγκέντρωσης των δειγμάτων των ασθενών γίνεται από μια καμπύλη βαθμονόμησης.

### 3.ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΦΥΛΑΞΗ:

Όταν φυλάσσονται στους 2 - 8 °C, τα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν έως την ημερομηνία λήξης που αναγράφεται σε κάθε ετικέτα.

3.1.

2 x 48 σωληνάρια από πολυυετερένιο (12 x 75 mm), επιστρωμένα με πολυκλωνικά αντι-οιστρόνης.

Αφήνετε συστηματικά τα επιστρωμένα σωληνάρια να φθάνουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

Φυλάσσετε τα μη χρησιμοποιημένα σωληνάρια στους 2-8 °C.

3.2. 

Ag	125I
----	------

κίτρινο, 42 ml

Μία φιάλη οιστρόνης σημασμένης με  $^{125}\text{I}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα με σταθεροποιητικό παράγοντα, συντηρητικό ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ) και κίτρινη χρωστική.

Κάθε φιάλη περιέχει λιγύτερο από 185 kBq (5 μCi).

3.3. 

CAL	N
-----	---

Σε κάθε φιαλίδιο περιέχεται 1 ml, εκτός από το φιαλίδιο για το βαθμονόμητρη 0: 2 ml - N = 0 έως 5

6 φιαλίδια ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ σε ορό που περιέχει συντηρητικό ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ).

Οι συγκεντρώσεις αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων. Φυλάσσετε στους 2-8 °C έως και 12 εβδομάδες. Για μεγαλύτερες περιόδους, φυλάσσετε στους -20 °C.

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

 2 φιαλίδια, λυοφιλοποιημένα - N=1 ή 2

2 φιαλίδια ανθρώπινου πλάσμα που περιέχει συντηρητικά ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Οι ελέγχους πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό μαζί με τα δείγματα του ασθενούς. Τα πεδία τιμών για τους ελέγχους αναγράφονται στις ετικέτες των φιαλιδίων.

Πριν από τη χρήση, να ανασυσταθούν τα περιεχόμενα των διαλυμάτων ελέγχου με 1 ml αποσταγμένου νερού. Πосле восстановления контроли стабильны в течение 7 дней при 2-8 °C. В течение более длительных периодов контрольные образцы следует аликовтировать и хранить при -20 °C в течение максимум 3 месяцев. Избегайте циклов замораживания / оттаивания.

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 70 x συμπυκνωμένο, 10 ml  
1 φιάλη συμπυκνωμένου ρυθμιστικού διαλύματος, που περιέχει αζίδιο του νατρίου ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Εγγύεται το διάλυμα σε 700 ml αποσταγμένου νερού. Восстановленный моющий раствор стабилен в течение 2 недель при 2-8 °C, покрытый пленкой, чтобы избежать загрязнения.

### 4.ΥΛΙΚΑ ΠΟΥ ΑΠΑΙΤΟΥΝΤΑΙ ΆΛΛΑ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ:

- Επιφάνειες πάγκου προστατευμένες με απορροφητικό χαρτί για να μειωθούν οι επιπτώσεις από πιπσίλισμα από πιπσίλισμα παραγόντων υλικού.
- Δοχεία απορριψής αποβλήτων σημασμένα όπως πρέπει και σχεδιασμένα κατάλληλα για στερεά ή υγρά ραδιενέργεια υλικά.
- Μη αυτόματες ή αυτοματοποιημένες μικροπιπέτες ακριβείας για τη διανομή των δειγμάτων ή των αντιδραστηρίων χωρίς κίνδυνο επιμόλυνσης.
- Απορροφητικό χαρτί.
- Αντλία κενού συνδεδεμένη μέσω σιφονιού, για αναρρόφηση
- Οριζόντιος αναδευτήρας (μέγ. 300 rpm)
- Απαριθμητής σπινθηρισμών γ ακτινοβολίας.

### 5.ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ:

#### 5.1. Συλλογή και χειρισμός των δειγμάτων αίματος:

Το δεύτερα αίματος είναι δυνατόν να συλλεχεί σε ένα στεγνό σωληνάριο ή σε ένα σωληνάριο που περιέχει αντιπηκτικό. Αν χρησιμοποιείται η παρίν, πρέπει να προστίθεται η ελάχιστη απαιτούμενη ποσότητα για την αποφυγή σχηματισμού θρόμβων.

Μετά από διαχωρισμό από τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα δείγματα πλάσματος ή ορού μπορούν να υποβάλλονται σε προσδιορισμό αρμέσως, εντός 24 ωρών, αν φυλάσσονται στους 2 - 8 °C, ή αργότερα, μετά από μια περίοδο έως και αρκετών μηνών, αν φυλάσσονται στους -20 °C. Πρέπει να αποφεύγεται η επανειλημένη κατάμυξη και απόψυξη.

#### 5.2. Διαδικασία του προσδιορισμού :

Τα αντιδραστήρια που φυλάσσονται στους 2°- 8° C πρέπει να φθάσουν σε θερμοκρασία δωματίου πριν από τη χρήση. Δεν πρέπει να αναμειγνύετε αντιδραστήρια από διαφορετικές παρτίδες. Σημάνετε τα σωληνάρια για T («Total» [μετρήσεις του ιχνηθέτη], μη χρησιμοποιείτε επιστρωμένα σωληνάρια), τους βαθμονομητές, τα δείγματα και τους ορούς ελέγχου.

Εκτελέστε τον προσδιορισμό εις διπλούν. Οι βαθμονομητές, οι οροί ελέγχου και τα δείγματα πρέπει να υποβάλλονται σε προσδιορισμό ταυτόχρονα.

#### 1. Καμπύλη βαθμονόμησης:

Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε βαθμονομητή στα αντίστοιχα σωληνάρια.

#### 2. Άγγωστα δείγματα και ελέγχους:

Διανείμετε με πιπέτα 100 μl από κάθε δείγμα ή ελέγχου στα αντίστοιχα σωληνάρια.

#### 3. Προθέστε 400 μl από τον ιχνηθέτη σημασμένης με $^{125}\text{I}$ οιστρόνης σε κάθε σωληνάριο.

4. Υποθάλλετε σε στροβιλισμό, καλύψτε και επωάστε επί 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε ένα οριζόντιο αναδευτήρα (μέγ. 300 rpm).

5. Αναρροφήστε προσεκτικά ή μεταγγίστε το διάλυμα όλων των σωληναρίων. (Εκτός από τα σωληνάρια που αφορούν τις μετρήσεις του ιχνηθέτη ["total"]).

6. Προσθέστε 2 ml από το διάλυμα πλύσης σε κάθε σωληνάριο. Αναρροφήστε ή μεταγγίστε προσεκτικά (Εκτός από

7. Επαναλάβετε το βήμα 6.

8. Μετρήστε τη δεσμευμένη σε κάθε σωληνάριο ραδιενέργεια επί τουλάχιστον 60 δευτερόλεπτα.

### 5.3. Επεξεργασία των δεδομένων:

Προσδιορίστε τη μέση τιμή κρούσεων για κάθε σετ διπλών σωληναρίου.

Υπολογίστε το λόγο Β/ΒΟ ως ακολούθως:

$$\text{Β/ΒΟ \%} = [\text{Βαθμονομητής ή cpm δειγματος / B0 (Βαθμονομητής 0) cpm}] \times 100$$

Σχεδιάστε την καμπύλη βαθμονόμησης σε ημιλογαριθμικό χαρτί αποτυπώνοντας το λόγο Β/ΒΟ % (γραμμική κλίμακα) που έχει ληφθεί για κάθε βαθμονομητή έναντι της αντίστοιχης του συγκέντρωσης, εκφρασμένης σε pg/ml (λογαριθμική κλίμακα). Οι συγκεντρώσεις ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ σε δείγματα είναι δυνατόν να αναγνωστούν απευθείας από τη καμπύλη βαθμονόμησης.

Αν χρησιμοποιείται ηλεκτρονικός υπολογιστής για τον υπολογισμό των αποτελεσμάτων, τα δεδομένα είναι δυνατόν να προσαρμοστούν στην κατάλληλη εξίσωση: σταθμισμένη 4 PL.

### 5.4. Παράδειγμα ενός τυπικού προσδιορισμού:

	Περιεχόμενα (pg/ml)	1 <sup>ο</sup> cpm επανάληψη	2 <sup>ο</sup> cpm επανάληψη	Μέση τιμή μέτρησης	B/Βο (%)	Οιστρόνη (pg/ml)
Μετρήσεις του ιχνηθέτη ("total")	-	50158	50055	50107	-	-
Βαθμονομητής 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Βαθμονομητής 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Βαθμονομητής 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Βαθμονομητής 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Βαθμονομητής 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Βαθμονομητής 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
Βαθμονομητής 1 χαμηλής τιμής	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
Βαθμονομητής 2 υψηλής τιμής	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Δείγμα 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Δείγμα 2	-	8490	8512	8501	56.5	149.1

Παράδειγμα ενός τυπικού προσδιορισμού (να μη χρησιμοποιηθεί για υπολογισμούς)

### 6. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ:

#### 6.1. Ειδικότητα

Στεροειδές	% Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα
Οιστρόνη	100,00
Οιστραδίλη	0,03
Οιστριόλη	0,005
DHEA-S	0,0003
Ανδροστενεδιόνη	Μη ανιχν.
Προγεστερόνη	Μη ανιχν.
Τεστοστερόνη	Μη ανιχν.
Θεική οιστρόνη	Μη ανιχν.
17 OH προγεστερόνη	Μη ανιχν.

#### 6.2. Ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ:

Η ελάχιστη ανιχνεύσιμη συγκέντρωση οιστρόνης έχει προσδιοριστεί στα 3,2 pg/ml και αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που παρέχεται από δύο τυπικές αποκλίσεις κάτω από το μέσο cpm 20 επαναλαμβανόμενων προσδιορισμών των μηδενικών βαθμονομητών.

#### 6.3. Δοκιμασία ανάκτησης:

Όταν σε ορούς με γνωστό περιεχόμενο ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ προστίθεται επιπλέον ΟΙΣΤΡΟΝΗ, επιτυγχάνεται ικανοποιητική συσχέτιση μεταξύ της προστεθείσας και της προσδιορισθείσας ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ.

Προστεθείσα E1 (pg/ml)	0	25	125
Προσδιορισθείσα E1 (pg/ml)	92,8	57,3	115,3
% ανάκτηση	-	97,3	106

#### 6.4. Δοκιμασία αραίωσης:

Η δοκιμασία αραίωσης υποδηλώνει ότι υπάρχει ανοσολογική ταυτότητα μεταξύ της ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ που είναι παρούσα στο δείγμα και της ΟΙΣΤΡΟΝΗΣ η οποία χρησιμοποιήθηκε για τη βαθμονόμηση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Συντελεστής αραίωσης	1	1/2	1/4	1/8
Προσδιορισθείσα E1 (pg/ml)	179,1	87,2	44,4	23,4
Αναμενόμενη (pg/ml)	-	89,6	44,8	22,4
% ανάκτηση	-	97,3	99	104,5

### 6.5. Αναπαραγωγιμότητα:

	Μέση τιμή (pg/ml)	Διακύμανση στα πλαίσια του ίδιου προσδιορισμού (% CV) 10 επαναλήψεων	Διακύμανση μεταξύ διαφορετικών προσδιορισμών (% CV) 5 διαφορετικών προσδιορισμών εις διπλούν
Μείγμα 1	27,03	5,0	10,55
Μείγμα 2	114,02	3,0	6,29
Μείγμα 3	227,2	10,9	8,89

### 7. ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ:

7.1. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από το παρόν και από οποιοδήποτε άλλο διαγνωστικό κίτ τη πρέπει να χρησιμοποιούνται και να ερμηνεύονται μόνο στο πλαίσιο μιας γενικότερης κλινικής εικόνας.

7.2. Μην χρησιμοποιείτε λιπαρικά, αιμολυμένα, ικτερικά ή θολά δείγματα.

### 8. ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΕΣ ΤΙΜΕΣ:

Συνιστάται κάθε εργαστήριο να καθιερώσει τις δικές του τιμές αναφοράς.

	Οιστρόνη (pg/ml)
Άνδρες	10 - 60
Γυναίκες	
Ωθυλακική φάση	50 - 100
Ωχρινική φάση	100 - 300
Εμμηνοπαυσιακές	ND - 60

### 9. ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ:

#### Μόνο για IN VITRO ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗ χρήση

##### ΠΡΟΣΟΧΗ: Ραδιενεργό υλικό

Το κιτ αυτό περιέχει το  $^{125}\text{I}$  (Χρόνος ημιζωής: 60 μέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονιζόμενα ακτινοβολία X (28 keV) και γ (35,5 keV).

Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφέρει και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων που πρόκειται να υποβάλλεται στην 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 παραβαθή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκευή του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων παραδοσιαστοποιων.

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.

##### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Αζίδιο του νατρίου

Μερικά στοιχεία του προσδιορισμού περιέχουν αζίδιο του νατρίου ως 0,1%. Απορρίψτε τα αντιδραστήρια έπιπλέοντας με άφθονο νερό μέσω του συστήματος της αποχέτευσης.

##### ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΗ: Δυνητικώς μολυσματικό υλικό

Να χειρίζεστε όλα τα στοιχεία (και όλα τα δείγματα των ασθενών) σαν να πρόκειται για ουσίες που δυνητικά μπορεί να μεταδώσουν ιογενείς νόσους, όπως η ηπατίτιδα Α και Β και το σύνδρομο επικήτης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας (AIDS).

Το αρχικό υλικό, το οποίο προήλθε από σωματικά υγρά ή όργανα και χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του παρόντος κι έχει ελεγχθεί και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικό ως προς την παρουσία HBsAg και αντι-HCV μέσω ανοσοπροσδιορισμού. Ωστόσο, καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να διασφαλίσει σε απόλυτο βαθμό ότι τέτοιοι είδους υλικού δεν περιέχουν τον αιτιολογικό παράγοντα της ιογενούς ηπατίτιδας.

Παρομοίως, όλα τα υλικά ανθρώπινης προέλευσης που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του παρόντος κι ελέγχθηκαν για την παρουσία αντισωμάτων έναντι του HIV-1 και -2 μέσω ενιζηματού αναστροφοροσδιορισμού και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά. Ωστόσο, η απουσία του αντισώματος αυτού δεν εγγυάται την απουσία του ιογενούς παράγοντα που ευθύνεται για το σύνδρομο της επικήτης ανοσοποιητικής ανεπάρκειας.

### 10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- Yallow R. and Berson S.: Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Canez MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Fairman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Oznaczenie radioimmunologiczne do ilościowego pomiaru estronu w osoczu lub surowicy ludzkiej

KIPI9100

DO DIAGNOSTYKI IN VITRO

pl

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

3.4. 

CONTROL	N
---------	---

## 1. PRZEZNACZENIE:

Do oznaczania poziomów ESTRONU w surowicy lub w osoczu metodą IN VITRO.

Pochodzenie estrogenów osoczowych u kobiet zostało dokładnie przebadane za pomocą technik rafinowanych rozcieńczeń izotopowych.

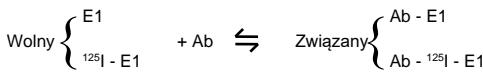
U zdrowych kobiet, estradiol osoczowy pochodzi w głównej mierze z jajnika, podczas gdy komórki osłonki pęcherzyka Graafa wydzielają androstenonion, który jest następnie przekształcany do estronu a następnie do estradiolu przez komórki warstwy ziarnistej.

W rzeczywistości, przez jajnik wytwarzana jest i wydzielana niewielka ilość hormonu: największa ilość substancji pochodzi z konwersji obwodowej estradiolu i z aromatyzacji androstenonionu, reakcji katalitycznej przeprowadzanej głównie w tkance tłuszczowej. U kobiet w wieku przedmenopauzanym, androstenonion jest wydzielany przez jajnik i nadnercza. U kobiet ciężarnych, nadnercza płodu wytwarzają znaczącą ilość androstenonionu. U kobiet w okresie menopauzy, estron jest podstawowym estrogenem wykrywanym w krążeniu i pochodzi głównie z konwersji androstenonionu wytworzonego w nadnerczach. Do zwiększenia wytwarzania estrogenu dochodzi wraz z wiekiem. Zjawisko to jest również związane z ilością tkanki tłuszczowej. Wpływ estrogenowe estronu u kobiet w okresie menopauzy mogą prowadzić do przerostu endometrium i krwawień, ale również pozwalają na utrzymanie składu mineralnego tkanki kostnej. U kobiet w wieku przedmenopauzanym, podwyższone poziomy estronu mogą wynikać z konwersji dużej ilości androstenonionu wytworzonego w zespołach mikropolicystycznych jajników i w guzach jajników. U takich kobiet, wysokie poziomy estronu we krwi krążącej mogą mieć wpływ na zaburzenia cyklu miesiączkowego.

Estron w krążeniu obwodowym jest głównie związany z albuminami. Jest to ważne zjawisko, które powinno być brane pod uwagę w trakcie interpretacji danych pochodzących z oznaczania estronu. W rzeczywistości, w przeciwieństwie do estradiolu, całkowite poziomy estronu nie są istotnie modyfikowane przez stężenie SHBG.

## 2. ZAŁOŻENIA METODY:

Oznaczenie ESTRONE (E1) CT RIA polega na zastosowaniu prawa działania mas zgodnie z następującym równaniem:



Ponieważ stężenia  $^{125}\text{I}$  - E1 i opłaszczonej przeciwniczej są stałe, osiągnięcie równowagi zależy od poziomu E1. Ilość  $^{125}\text{I}$  - E1 związana w opłaszczonej próbówce jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia E1 w próbce.

Po okresie inkubacji, zawartość próbki jest płukana w celu usunięcia nadmiaru niezwiązanego oznakowanego  $^{125}\text{I}$  - E1.

Stężenia substancji w próbce pacjenta odczytywane są za pomocą krzywej kalibracyjnej.

## 3. MATERIAŁY DOSTARCZONE I PRZECHOWYWANIE:

Przechowywany w temperaturze 2-8°C materiał, może być wykorzystywany do daty ważności wydrukowanej na każdej etykietce.

- 3.1. 2 x 48 próbówek polistyrenowych (12 x 75 mm) opłaszczonej przeciwiałami poliklonalnymi anty-Estron. Przed użyciem należy zawsze umożliwić osiągnięcie przez opłaszczone próbówki temperatury pokojowej. Nieużywane próbówki należy przechowywać w temperaturze 2-8°C.

- 3.2. 

Ag	125I
----	------

 żółte, 42 ml Jedna butelka ESTRONU znakowanego  $^{125}\text{I}$  w buforze ze stabilizatorem, środkiem konserwującym ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ) i żółtym barwnikiem. Każda butelka zawiera mniejszą dawkę substancji promieniotwórczych niż 185 Kbq (5  $\mu\text{Ci}$ )

- 3.3. 

CAL	N
-----	---

 1 ml w każdej fiołce -- z wyjątkiem dla Kalibratora 0 : 2 ml N= od 0 do 5 6 fiolek ESTRON w surowicy z zawartością środka konserwującego ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Stężenia są wydrukowane na etykietach. Przechowywać w temperaturze 2-8°C do 12 tygodni. W razie konieczności przechowywania przez dłuższy okres, należy przechowywać w temperaturze -20°C.

2 fiolki materiał opłaszcowany - N= 1 lub 2  
2 fiolki ludzkiej plazmy z zawartością środka konserwującego ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Kontrolne powinny być oznaczone razem z próbkami pacjentów. Zakresy dla kontrolnych są wydrukowane na etykietach fiolek. Przed użyciem, kontrolne należy rekonstytuować przy pomocy 1 ml wody destylowanej. Po rekonstytucji kontrolne są stabilne przez 7 dni w temperaturze 2-8 °C. W dłuższych okresach kontrole należy podzielić na porcje i przechowywać w temperaturze -20 °C przez maksymalnie 3 miesiące. Unikać cykli zamrażania / rozmrzania.

3.5. 

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

 roztwór 70 x stężony, 10 ml 1 butelka stężonego roztworu buforowego, zawierającego azydok sodowy ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Nalać roztwór do 700 ml wody destylowanej. Odtworzony roztwór do płukania jest stabilny przez 2 tygodnie w temperaturze 2-8 °C przykryty folią klejącą, aby uniknąć zanieczyszczenia.

## 4. MATERIAŁY WYMAGANE LECZ NIE ZAWARTE W ZESTAWIE:

- powierzchnie robocze, zabezpieczone papierem absorbacyjnym, w celu ograniczenia ryzyka wycieku płynnych substancji radioaktywnych.
- pojemniki na odpady, odpowiednio oznakowane i przeznaczone do przechowywania stałych lub ciekłych materiałów radioaktywnych.
- mikropipety ręczne lub automatyczne do dozowania próbek lub odczynników, bez możliwości skażenia krzyżowego.
- papier absorbencyjny.
- pompa próżniowa podłączona przez syfon do aspiracji.
- wytrząsarka pozioma (maksymalnie 300 obr/min)
- licznik scyntylacyjny promieniowania gamma.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Pobieranie i postępowanie z próbkami krwi:

Próbki krwi mogą być pobierane do suchej próbówki lub do zawierającej antykoagulant. W przypadku stosowania heparyny, należy dodawać wyłącznie minimalną ilość, aby uniknąć wytworzenia skrzepu.

Po oddzieleniu od elementów morfocytycznych, osocza lub próbki surowicy mogą być oznaczone od razu, w ciągu 24 godzin, jeżeli są przechowywane w temperaturze od 2 do 8°C lub później, w okresie kilku miesięcy, jeżeli są przechowywane w temperaturze -20°C. Należy unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrzania.

### 5.2. Procedura oznaczenia:

Odczynniki przechowywane w temperaturze od 2°C do 8°C przed zastosowaniem muszą zostać doprowadzone do temperatury pokojowej. Nie wolno mieszać odczynników pochodzących z różnych serii. Należy odpowiednio oznaczyć próbówki jako T (« Total Counts ») – próbówki do całkowitego zliczania – nie używać do tego próbówek opłaszczonej) oraz próbówki kalibratorów, próbek i kontrol.

Oznaczenie należy wykonywać podwójnie. Kalibrator, kontrole i próbki muszą być oznaczone w tym samym czasie.

#### 1. Krzywa kalibracyjna:

Pipetować po 100  $\mu\text{l}$  każdego kalibratora do odpowiednich próbówek.

#### 2. Próbki nieznanego i kontrole:

Pipetować po 100  $\mu\text{l}$  każdej próbki lub kontrolne do odpowiednich próbówek.

#### 3. Dodać 400 $\mu\text{l}$ znacznika $^{125}\text{I}$ – ESTRON do każdej próbówki.

4. Wymieszać za pomocą mieszadła typu Worteks, przykryć i inkubować przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w wytrząsarce poziomej (maksymalnie 300 obr/min).

5. Dokładnie aspirować roztwory lub osuszyć (przed osuszeniem należy dodać 2 ml roztworu pluczającego do każdej próbówki) wszystkie próbówki. (Z wyjątkiem próbówek do całkowitego zliczania).

6. Dodać 2 ml roztworu pluczającego do każdej próbówki. Dokładnie aspirować lub osuszyć zawartość.

7. Powtórzyć etap 6.

8. Zliczać poziom radioaktywności dla każdej próbówki przez co najmniej 60 sekund.

### 5.3. Przetwarzanie danych:

Określić średnią prędkość zliczania dla każdego zestawu podwójnych próbówek.

Obliczyć stosunek B/B0, jak przedstawiono poniżej:

$$B/B0 \% = [ \text{liczba zliczeń na minutę (cpm)} \text{ kalibratora lub próbki } B / B_0 (\text{Kal 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Wykreślić krzywą kalibracyjną, wykreślając stosunek B/B0 % (skala liniowa) uzyskany dla każdego kalibratora, w odniesieniu do ich odpowiednich stężeń,

wyrażonych w pg/ml (skala logarytmiczna). Stężenia ESTRON w próbkach mogą być odczytane bezpośrednio z krzywej kalibracyjnej.  
Jeżeli do obliczania wyników wykorzystywany jest komputer, dane mogą być dopasowane do właściwego równania: weighed 4 PL.

#### 5.4. Przykład typowych oznaczeń:

	Zawartość (pg/ml)	cpm pierwsza duplikacja	cpm druga duplikacja	Średnia przedkość zliczania	B/Bo (%)	Estron (pg/ml)
Liczba zliczeń całkowitych	-	50158	50055	50107	-	-
Kal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Kal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Kal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Kal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Kal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Kal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 poziom niski	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 poziom wysoki	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
Próbka 1	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
Próbka 2	-	8490	8512	8501	56.5	149,1

Przykład typowego oznaczenia (nie powinien być wykorzystywany do obliczeń)

#### 6. CHARAKTERYSTYKA DZIAŁANIA:

##### 6.1. Swoistość

Steryd	% reaktywności krzyżowej
Estron	100,00
Estradiol	0,03
Estriol	0,005
DHEA-S	0,0003
Androstenodion	nie wykryto
Progesteron	nie wykryto
Testosteron	nie wykryto
Estron - Siarczan	nie wykryto
17 OH Progesteron	nie wykryto

##### 6.2. Minimalne wykrywalne stężenie ESTRON:

Minimalne wykrywalne stężenie zostało oznaczone na poziomie 3,2 pg/ml i odpowiada stężeniu wynikającemu z dwóch odchyleń standardowych, poniżej średniej liczb zliczeń na minutę 20 powtórnych oznaczeń kalibratora zerowego.

##### 6.3. Test odzysku:

Surowice o znanych zawartościach ESTRONU zawierające dodatkową suplementację ESTRONU, które zostały oznaczone po dodaniu właściwej korelacji.

Dodane E1 (pg/ml)	0	25	125
Oznaczone E1 (pg/ml)	92,8	57,3	115,3
% odzysk	-	97,3	106

##### 6.4. Test rozcieńczeń:

Test rozcieńczeń wskazuje na to, czy występuje identyczność immunologiczna pomiędzy ESTRONEM obecnym w surowicy i ESTRONEM wykorzystywanym do kalibracji krzywej standardowej.

Współczynnik rozcieńczeń	1	1/2	1/4	1/8
Oznaczone E1 (pg/ml)	179,1	87,2	44,4	23,4
Oczekiwane E1 (pg/ml)	-	89,6	44,8	22,4
% odzysk	-	97,3	99	104,5

##### 6.5. Odtwarzalność:

	Wartość średnia (pg/ml)	Zmienna w serii (% CV) 10 powtórnych oznaczeń	Zmienna pomiędzy seriami (% CV) 5 oddzielnych oznaczeń w oznaczeniach podwójnych
Pula 1	27,03	5,0	10,55
Pula 2	114,02	3,0	6,29
Pula 3	227,2	10,9	8,89

#### 7. OGRODZENIA PROCEDURY

- Wyniki uzyskane na podstawie tego lub innych zestawów diagnostycznych, powinny być stosowane i interpretowane w kontekście całkowitego obrazu klinicznego.
- Nie wolno wykorzystywać próbek lipemicznych, hemolizowanych, żółtaczkowych lub mętnych.

#### 8. OCZEKIWANE WARTOŚCI

Zaleca się, aby każde laboratorium opracowało własne zakresy referencyjne.

	Estron (pg/ml)
Mężczyźni	10 - 60
Kobiety	
Faza follicularna	50 - 100
Faza lutealna	100 - 300
Okres menopauzalny	ND - 60

#### 9. OSTRZEŻENIA I ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

##### Przeznaczone wyłącznie do DIAGNOSTYKI IN VITRO.

##### UWAGA: Materiał radioaktywny

W Zestaw zawiera  $^{125}\text{I}$  (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i y (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 powinna 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.

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

##### OSTRZEŻENIE: Azydek sodu

Niektoří składník závěravý azydek sodu jako srodek konserwující ( $\text{NaN}_3 < 0,1\%$ ). Odčinník náleží utylizovat, vylevajat je do kanalizace i splukujat dužou ilošćí wody.

##### OSTRZEŻENIE: Materiał potencjalnie zakaźny

Wszystkie składník (i wszyskie próbki pacjentów) należą traktować jako materiał potencjalnie zakaźny, mogący zawierać wirusy zapalenia wątroby B i C lub nabytego zespołu upośledzenia odporności (AIDS).

Materiał źródłowy, pochodzący z płynów uzyskiwanych z ciała ludzkiego lub tkanek, wykorzystywany w przygotowaniu tego zestawu, był przebadany metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki testów na obecność HBsAg i przeciwciel anty-HCV były ujemne. Jednak żadna metoda nie może zagwarantować, że taki materiał nie zawiera wirusów zapalenia wątroby.

W podobny sposób, wszystkie materiały wykorzystywane do przygotowywania tego zestawu były badane przesiewowo pod kątem obecności wirusów HIV-1 i -2 metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki tych badań były ujemne. Jednak brak przeciwciela przeciwko tym wirusom nie może zagwarantować nieobecności wirusów odpowiadających za występowanie zespołu nabytego upośledzenia odporności.

#### 10. BIBLIOGRAFIA

- Yalow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait J.F. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Caney MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Fairman C., Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.



# ESTRONE-RIA-CT

Radioimmun vizsgálat (RIA) ösztron mennyiségi meghatározására emberi szérumban vagy plazmában

KIPI9100

**IN VITRO DIAGNOSZTIKAI FELHASZNÁLÁSRA**

hu

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 91

## 1.A VIZSGÁLAT CÉLJA:

Emberi vérsváj vagy plazma ösztron-szintjének *in vitro* meghatározása.

A plazmában található ösztron pontos eredményt izotóphigításos technikák segítségével állapították meg.

Egészséges nőkben az ösztradiol a petefészkekben származik. A thecasejtek antrosztendion választanak el, amit aztán a granulosasejtek ösztronná, majd ösztradiollá alakítanak.

Valójában az ösztronnak csak kis részét termeli és választja el a petefészek: legnagyobb része az ösztradiol perifériás átalakításával, illetve az androstanedion aromatizálásával jön létre. Menopauza előtt az androstanedion a petefészkek és a mellékvesék termelik. Terhes nőkben a magzati mellékvese is jelentős mértékben hozzájárul a szervezet androstanedion-termeléséhez. Menopauza után az ösztron a vérkeringésben jelen levő legfontosabb ösztrogén, és a mellékvese által termelt androstanedion átalakításából származik. A kor előrehaladtával fokozódik az ösztrogén-termelés, valamint összefügg a lerakódott zsírszövet mennyiségeivel is. Az ösztron ösztrogén hatása menopauzás nőkben méhnyálkahártya hyperplasztát és vérzést okozhat, egyúttal azonban fenntarja a csontok ásványianyag-tartalmát. Menopauza előtt a vér túl magas ösztron-szintjét a micropolykristás ovárium szindróma (PCOS) során termelődött nagy mennyiséget androstanedion átalakítása, vagy petefészek-daganat okozhatja. Ilyen esetekben a vér magas ösztron-szintje szerepet játszhat a menstruációs ciklus zavaraiaból.

A vérben az ösztron elsősorban albuminhoz kötött formában van jelen. Ez fontos a ösztron-koncentráció vizsgálati eredményének értékelése szempontjából. Az ösztradiollal ellentétben tehát az ösztron teljes mennyiséget nem befolyásolja nagymértékben a SHBG (sex hormone binding globulin) koncentrációja.

## 2.A MÓDSZER ELVE: AZ ÖSZTRON (E1) CT RIA a tömeghatás törvényén alapul a következő egyenlet szerint:

E1

Ab - E1

Szabad { + Ab ⇌ Kötött {

<sup>125</sup>I - E1

Ab - <sup>125</sup>I - E1

Mivel a <sup>125</sup>I - E1 és a rögzített ellenanyag koncentrációja állandó, az egyensúly eltolódásának mértéke az E1 szintjétől függ. A cső falához kötődött <sup>125</sup>I - E1 mennyisége fordítottan arányos a minta E1-koncentrációjával.

Inkubáció után a felesleges, meg nem kötött <sup>125</sup>I - E1-et mosással lehet eltávolítani. Ezt követően a minták ösztron-koncentrációja a kalibrációs görbéről olvasható le.

## 3. A REAGENSEK ÉS TÁROLÁSUK:

A reagensek 2-8°C-on a címkekben feltüntetett lejárati időig használhatók fel.

3.1.

2 x 48 db poliklonális anti-ösztron ellenanyaggal borított polisztién cső (12 x 75 mm). Használat előtt várja meg, amíg a csövek szobahőmérsékletre felmelegednek. A fel nem használt csöveket 2-8 °C között tárolja.

3.2.

sárga, 42 ml  
1 üveg <sup>125</sup>I-tel jelölt ÖSZTRON pufferben („tracer”), stabilizátor, tartósítószert ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ) és sárga festéket tartalmaz.

Üvegenként kevesebb, mint 185 kBq-t (5  $\mu\text{Ci}$ ) tartalmaz.

3.3.

1 ml ampullánként, kivéve a Calibrator 0 : 2 ml  
 $N = 0$ -tól 5-ig  
6 ampulla ÖSZTRON emberi vérsvában, tartósítószert tartalmaz ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). A koncentrációk az ampullák címkein vannak feltüntetve. 2-8°C-on legfeljebb 12 hétag, -20°C-on hosszabb ideig is eltartható.

3.4.

2 ampulla liofilizált - N=1 vagy 2  
2 ampulla emberi plazma, tartósítószert tartalmaz ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). A kontrollon a mintákkal együtt kell vizsgálni. A rajuk vonatkozó értékhátról az ampullák címkein vannak feltüntetve.  
Használat előtt, oldja fel a kontrollokat 1 ml desztillált vízben. Feloldás után a kontrollok 7 napig stabilak 2-8 °C-on. Hosszabb ideig a kontrollokat alíkvetőkba kell sorolni, és -20 °C-on tartani maximum 3 hónapig. Kerülje a fagyás / olvadás ciklusait.

3.5.

**WASH**   **SOLN**   **CONC**

70 x mosóoldat koncentrátum, 10 ml

1 üveg koncentrált puffer oldat, nátrium-azidot tartalmaz ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Hígitsa az oldatot 700 ml desztillált vízben. A feloldott mosóoldat 2 hétag 2-8 °C-on stabil ragasztófóliával, a szennyeződés elkerülése érdekében.

## 4. A FELHASZNÁLÓ ÁLTAL BIZTOSÍTOTT ANYAGOK:

- nedvszívó papírral letakart munkafelület, ami csökkenti az esetlegesen kiomlott radioaktív anyag okozta veszélyt.
- megfelelően felcímkezett, szilárd és folyékony radioaktív anyagok gyűjtésére alkalmas kidobóedény
- kézi és automata precíziós mikropipetták a minták és reagensek keresztszennyezés nélküli méréséhez
- nedvszívó papír
- szűrővel ellátott vízlegszivattyú felülíuszó eltávolításához
- vízszintes rázógép (max 300 rpm)
- gamma-sugárzásmórról.

## 5. MÓDSZERTAN

### 5.1. Vérminták levétele és kezelése:

A vérmintát egy száraz vagy alvadágátlót tartalmazó csőbe kell levenni. Heparin alkalmazása esetén a lehető legkisebb mennyiséget használja az alvadás megakadályozására.

A vörösvérsejtektről történt elválasztás után, a plazma vagy a savó azonnal vízgáthalát, 2-8°C-on tárolva 24 óráig, -20°C-on tárolva akár hónapokig is felhasználható. Kerülje a minták többszöri lefagyásztását és felolvasztását.

### 5.2. A vizsgálat menete :

Használat előtt várja meg, hogy a 2-8°C-on tárolt reagensek felmelegedjenek szobahőmérsékletre. Ne keverje az eltérő gyártási számú reagenskészletekből származó anyagokat. Feliratott megfelelő számú csövet a kalibrátorok, a minták, a kontrollok és a <sup>125</sup>I - E1 teljes mennyiségeinek mérésére szolgáló csövek („totál”) számára. Ez utóbbi célra ne használjon ellenanyaggal borított csöveget.

Mindig két párhuzamos vizsgálatot végezzen. A kalibrátorokat, kontrollokat és mintákat egyidejűleg kell vizsgálni.

#### 1. Kalibrációs görbe:

Mérjen 100  $\mu\text{l}$ -t minden kalibrátorból a megfelelő csövekbe.

#### 2. Ismeretlen és kontrollok:

Mérjen 100  $\mu\text{l}$ -t minden mintából és kontrollok a megfelelő csövekbe.

#### 3. Mérjen 400 $\mu\text{l}$ of <sup>125</sup>I - ÖSZTRON tracert minden csőbe.

4. Vortexelje és fedje be a csöveket, helyezze őket vízszintes rázógépre (max. 300 rpm), majd inkubálja őket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten.

5. A totálok kivéve óvatosan távolítsa el a felülíuszót a csövekből (szívja le vízlegszivattyú segítségével vagy öntse le). Leontés előtt mérjen a csövekbe 2 ml mosóoldatot.

6. Mérjen 2 ml mosóoldatot a csövekbe. Óvatosan távolítsa el a felülíuszót a csövekből.

#### 7. Ismételje meg a 6. lépést.

8. Mérje a radioaktivitást minden csőben legalább 60 másodpercen keresztül.

### 5.3. Eredmények értékelése:

Határozza meg a radioaktivitás mértékét párhuzamosan vizsgált csöpárokban.

Számítsa ki a B/B0 értékeket a következők szerint:

$$B/B0 \% = [ \text{kalibrátor vagy minta cpm} / B0 (\text{kalibrátor 0}) \text{ cpm} ] \times 100$$

Rajzolja fel a kalibrációs görbét úgy, hogy a kalibrátorok B/B0 % értékeit a lineáris, a hozzájuk tartozó koncentrációkat (pg/ml) pedig a logaritmikus skálán ábrázolja. A minták ösztron-koncentrációi közvetlenül leolvashatók a kalibrációs görbéről.

Ha az eredményeket számítógép segítségével értékelni, a mért adatok behelyettesíthetők a megfelelő egyenletbe: súlyozott 4 PL.

5.4. Példa egy jellegzetes mérési adatsorra:

	Koncentráció (pg/ml)	Első vizsgálat (cpm)	Második vizsgálat (cpm)	Átlag	B/Bo (%)	Ösztron (pg/ml)
Totálók	-	50158	50055	50107	-	-
Cal 0	0	15459	14618	15039	100.0	-
Cal 1	15	13641	13125	13383	89.0	-
Cal 2	55	11572	10720	11146	74.1	-
Cal 3	115	9103	9337	9220	61.3	-
Cal 4	260	6787	7207	6997	46.5	-
Cal 5	815	3705	3578	3642	24.2	-
C 1 alacsony	34 - 48	11973	11582	11777	78.3	42.3
C 2 magas	170 - 220	7450	8064	7757	51.6	198.5
1. minta	-	12485	12612	12549	83.4	28.1
2. minta	-	8490	8512	8501	56.5	149.1

Ezek az adatok csak példaként szolgálnak, ne használja fel öket számításaihoz!

## 6. MINŐSÉGI JELLEMZŐK:

### 6.1. Specificitás

Szteroid	% Keresztreaktivitás
Ösztron	100.00
Ösztradiol	0.03
Ösztriol	0.005
DHEA-S	0.0003
Androstanedion	N.D.
Progeszteron	N.D.
Tesztoszteron	N.D.
Ösztron-szulfát	N.D.
17-OH-Progeszteron	N.D.

### 6.2. A kímutathatóság alsó határa:

Vizsgálatok szerint a legalacsonyabb kímutatható koncentráció 3.2 pg/ml. Ez megegyezik azzal a koncentráció értékkel, ami a 0-kalibrátor húsz vizsgálatának átlagából számolható a standard deviáció kétszeresének levonásával.

### 6.3. Visszanyerés:

Ha ismert ösztron-koncentrációjú savókhöz további ismert mennyiségi ösztront adnak, a vizsgálat eredménye megfelelő korrelációt mutat a hozzáadott és a mért ösztron mennyisége között.

Hozzáadott E1 (pg/ml)	0	25	125
Mért E1 (pg/ml)	92.8	57.3	115.3
% Visszanyerés	-	97.3	106

### 6.4. Higítási vizsgálat:

A higítási vizsgálat azt mutatja, hogy a kalibrátorokban és a mintákban található ösztron immunológiaiag azonos.

Hígítás mértéke	1	1/2	1/4	1/8
Mért E1 (pg/ml)	179.1	87.2	44.4	23.4
Várt E1 (pg/ml)	-	89.6	44.8	22.4
% Visszanyerés	-	97.3	99	104.5

### 6.5. Reprodukálhatóság:

	Átlag (pg/ml)	Vizsgálaton belüli variáció (% CV) 10 ismétlés	Vizsgálatok közötti variáció (% CV) 5 független vizsgálat (vizsgálatonként 2 párhuzamos)
Pool 1	27.03	5.0	10.55
Pool 2	114.02	3.0	6.29
Pool 3	227.2	10.9	8.89

## 7. AZ ELJÁRÁS KORLÁTAI:

- Az ezzel, vagy bármely más diagnosztikai reagenskészlettel kapott adatok csak a beteg más klinikai eredményeit is figyelembe véve értékelhetők és használhatók fel.
- Ne használjon lipaemiás, haemolizált, icterusos, vagy zavaros mintákat.

## 8. VÁRT ÉRTÉKEK:

Ajánlott minden laboratóriumnak meghatároznia saját referenciartományát.

	Ösztron (pg/mL)
Férfiak	10 - 60
Nők	
Follicularis fázis	50 - 100
Lutealis fázis	100 - 300
Menopauza után	ND - 60

## 9. MUNKAVÉDELMI SZABÁLYOK:

### Csak IN VITRO DIAGNOSZTIKAI felhasználásra

#### FIGYELEM: Radioaktív anyag

A kit röntgen (28 keV) és gamma (35,5 keV) sugárzó 125I izotópot (felezési idő: 60 nap) tartalmaz.

A reagenskészletben található radioaktív anyagot csak arra jogosult személyek vehetik át és használhatják fel. Radioaktív termékek beszerzésére, tárolására, használataira, és cseréjére az adott ország törvényei érvényesek. A reagensek alkalmazása emberek és állatokon is minden körlümenyek között tilos.

Minden, radioaktív reagenssel végzett műveletet egy arra kijelölt, elkülönített helyen kell elvégezni. A laboratóriumba érkezett radioaktív anyagok átvételéről és tárolásáról vezetett jegyzőkönyvet a laboratórium területén kell tartani. Azokat a laboratóriumi eszközökkel és üvegedényeket, amelyek radioaktív anyaggal szennyeződhetek, különítse el, hogy elkerülje a különböző radioizotóppal történő keresztszennyeződést.

Amennyiben bármilyen radioaktív anyag kiömlik, azonnal takarítsa fel az erre vonatkozó előírásoknak megfelelő módon. A keletkező radioaktív hulladékot a helyi szabályoknak és az illetékes hatóságok erre vonatkozó útmutatásának megfelelően kell kidobni. Ha betartja a radioaktív anyagok kezelésére vonatkozó alapvető szabályokat, megfelelően védett lesz a sugárítéstől.

Ne dohányozzon, ne fogyasszon ételt vagy italt, illetve ne használjon kozmetikumokat a laboratóriumban. Ne pipettázzon szájjal. Munka közben viseljen laborköpenyt és egyszer használatos kesztyűt.

#### VIGYÁZAT: Nátrium-azid

A készlet egyes reagensei nátrium-azidot tartalmaznak tartósítószerként ( $\text{NaN}_3 < 0.1\%$ ). Ezeket a reagenseket a csapba nagy mennyiséggel vízzel együtt öntse ki.

#### VIGYÁZAT: Potenciálisan fertőzésveszélyes anyagok

Kezeljen minden emberi vérsvárból készült reagenst (és minden betegekből származó mintát) potenciálisan hepatitis B, C, illetve HIV vírussal fertőzöttként.

A reagenskészlet előállításához használt emberi testfolyadékokból és szervekből nyert anyagokat szerológiai módszerekkel megvizsgálták, és negatívnak találták HbsAg-re, és anti-HCV ellenanyagokra. Egyetlen ismert vizsgálat alapján sem állítható azonban teljesen biztosan, hogy az ilyen anyagok nem tartalmaznak virális hepatitis okozó kórokozókat.

A reagenskészlet előállításához használt emberi eredetű anyagokat HIV-1 és 2 ellen termelt ellenanyagokra is megvizsgálták, és negatívnak találták EIA vizsgállal. Ezen ellenanyagok hiánya azonban nem zára ki az AIDS kórokozójának jelenlétéét.

## 10. IRODALOM:

- Yallow R. and Berson S. : Principles of Competitive Protein Binding Assays, Odell W. and Daughaday W. (eds.), Ch.1 : 1971. J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Baird DT, Horton R, Longcope C, Tait JF. : Steroid dynamics under steady state conditions. Rec. Progr. Horm. Res. 25 : 611-664, 1969.
- Caney MS, Lee KJ, Olive DL : Progestogens and estrogens. Infert Reprod. Med. Clin. North Amer. 3 : 59-78, 1992.
- Faiman C, Winter JDS, Reyes FI, Patterns of gonadotrophins and gonadal steroids throughout life. Clin. Obstet. Gynecol. 3:467 -483, 1976.