



E2-RIA-CT

KIP0629

Read entire protocol before use.

E2-RIA-CT

I. INTENDED USE

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

II. GENERAL INFORMATION

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

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

III. CLINICAL BACKGROUND

- A. Biological activity**
17-beta-estradiol (E2) is a C-18 steroid hormone (molecular weight 272.4 Da) produced mainly by the ovary and placenta, and in small amounts by adrenals and testes. Estradiol is in equilibrium with estrone, which can be converted to estriol by the liver and placenta.
- B. Clinical applications**
Like for LH-FSH-progesterone, measurement of estradiol concentration in serum, peritoneal fluid and follicular fluid is an essential biochemical tool for the investigation of fertility, tumor and sexual diseases, and disorders of hypothalamic/pituitary/gonadal axis, for example :
- . To detect the follicular phase;
 - . To check the effectiveness of the induction of ovulation (with ultrasound) and the level of E2 in follicular fluid makes it possible to detect normal or dysfunctional ovulation induction (the empty follicle syndrome may reflect a dysfunctional ovulation induction);
 - . To diagnose the luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome (by the estimation of 17 beta-estradiol and progesterone levels in peritoneal fluid);
 - . To aid in the diagnosis of breast tumors (total estrogens - E1-E2 - and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity are significantly higher in malignant than in non malignant breast tissues);
 - . With LH-FSH and E2 levels, it is possible to suspect a Stein Cohen-Leventhal syndrome;
 - . Other areas of investigation are : premature adrenarche, gynecomastie and menopausal period.

IV. PRINCIPLES OF THE METHOD

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

V. REAGENTS PROVIDED

Reagents	96 Test Kit	Colour Code	Reconstitution
 Tubes coated with anti E2	2 x 48	brown	Ready for use
Ag¹²⁵I CONC TRACER: ^{125}I Iodine labelled E2 (HPLC grade) in ethanol solution	1 vial 1 ml 142 kBq	red	Transfer quantitatively the ethanol solution in the tracer buffer
TRACER BUF Tracer Buffer with bovine gelatin and azide (<0.1%)	1 vial 53 ml	black	Ready for use
CAL 0 Zero calibrator in human serum and azide (0.5%)	1 vial 5 ml	yellow	Ready for use
CAL N Calibrators E2 N = 1 to 6 (see exact values on vial labels) in human serum and azide (0.5%)	6 vials 1 ml	yellow	Ready for use
WASH SOLN CONC Wash solution (TRIS-HCl)	1 vial 10 ml	brown	Dilute 70 x with distilled water (use a magnetic stirrer).
CONTROL N Controls - N = 1 or 2 in human serum and thymol	2 vials lyophilized	silver	Add 0.5 ml distilled water

Note : Use the zero calibrator for sample dilutions.

VI. SUPPLIES NOT PROVIDED

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

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

VII. REAGENT PREPARATION

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

VIII. STORAGE AND EXPIRATION DATING OF REAGENTS

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

IX. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

- Serum samples must be kept at $2-8^\circ\text{C}$.
- If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended.
- Avoid successive freezing and thawing.

X. PROCEDURE

A. Handling notes

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

B. Procedure

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

XI. CALCULATION OF RESULTS

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

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

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

XII. TYPICAL DATA

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

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Total count	47330	
Calibrator		
0 pg/ml	19724	100.0
18 pg/ml	17947	91.0
35 pg/ml	14990	76.0
152 pg/ml	10995	55.7
433 pg/ml	6012	30.5
1818 pg/ml	2439	12.4
3604 pg/ml	1630	8.3

XIII. PERFORMANCE AND LIMITATIONS

A. Detection limit

Twenty two zero calibrators were assayed along with a set of other calibrators.
The detection limit, defined as the apparent concentration two standard deviations below the average counts at zero binding, was 6.4 pg/ml.

B. Specificity

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

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

C. Precision

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

SD: Standard Deviation; CV: Coefficient of variation

D. Accuracy

DILUTION TEST			
Dilution	Theoretical Concent. (pg/ml)	Measured Concent. (pg/ml)	Recovered (%)
1/1	1877.0	1877.0	100
1/2	938.5	801.4	85
1/4	469.3	412.7	88
1/8	234.6	180.8	77
1/16	117.3	96.7	82
1/32	58.7	58.7	100
1/64	29.3	25.5	87
1/128	14.7	15.4	105

Samples were diluted with the zero calibrator.

Measured and theoretical concentrations were consistent:
Y (measured) = 0.99X (theoretical) – 27.0, R² = 0.995

RECOVERY TEST

Sample	Added E2 (pg/ml)	Theoretical E2 (pg/ml)	Measured E2 (pg/ml)	Recovered (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
2	3000	3013	2912	97
	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Measured and theoretical concentrations were consistent:
- Samples 1: Y (measured) = 0.98X (theoretical) + 0.9, R² = 0.998
- Samples 2: Y (measured) = 0.93X (theoretical) + 10.2, R² = 1.000

Conversion factor :

From ng/ml to nmol/L : x 3.68
From nmol/L to ng/ml : x 0.272

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

E. Time delay between last calibrator and sample dispensing

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

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

XIV. INTERNAL QUALITY CONTROL

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

XV. REFERENCE INTERVALS

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

	Concentration range (2.5 to 97.5% percentiles) (pg/ml)	Median concentration (pg/ml)	Number of subjects
Normal males	15 - 47	27	59
Normal Females			
· Follicular phase (day –10 to –3)	50 – 482	137	35
· Preovulatory phase (day –1 & 0)	66 – 488	176	33
· Luteal phase (day 3 to 10)	51 – 376	119	40
· Postmenopausal	6 - 53	16	72
Pregnancy			
· First trimester	510 - 6300		20
· Second trimester	2400 - 18900		26
· Third trimester	11900 - 37100		20

XVI. PRECAUTIONS AND WARNINGS

Safety

For in vitro diagnostic use only.

This kit contains ^{125}I (half-life: 60 days), emitting ionizing X (28 keV) and γ (35.5 keV) radiations. This radioactive product can be transferred to and used only by authorized persons; purchase, storage, use and exchange of radioactive products are subject to the legislation of the end user's country. In no case the product must be administered to humans or animals.

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

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

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

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

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

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

XVII. BIBLIOGRAPHY

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

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

XVIII. SUMMARY OF THE PROTOCOL

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

DIAsource Catalogue Nr : KIP0629	P.I. Number : 1700461/en	Revision nr : 150324/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Revision date : 2015-03-24

Lire entièrement le protocole avant utilisation.

E2-RIA-CT

I. BUT DU DOSAGE

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

II. INFORMATIONS GENERALES

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

Pour une assistance technique ou une information sur une commande :

Tel : +32 (0)10 84.99.11

Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. CONTEXTE CLINIQUE

A. Activités biologiques

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

B. Application clinique

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

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

IV. PRINCIPE DU DOSAGE

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

V. REACTIFS FOURNIS

Réactifs	96 Tests	Code couleur	Reconstitution			
 Tubes recouverts avec l'anti E2	2 x 48	brun	Prêt à l'emploi			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td><td>CONC</td></tr></table> TRACEUR: E2 marquée à l' ¹²⁵ Iodine (grade HPLC) dans une solution ethanol.	Ag	¹²⁵ I	CONC	1 flacon 1 ml 142 kBq	Rouge	Transférer quantitativement la solution d'éthanol dans le Tampon Traceur.
Ag	¹²⁵ I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table> Tampon Traceur avec de la gélatine bovine et de l'azide.(<0,1%)	TRACEUR	BUF	1 flacon 53 ml	noir	Prêt à l'emploi	
TRACEUR	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Calibrateur zéro dans du sérum humain et de l'azide. (0,5%)	CAL	0	1 flacon 5 ml	Jaune	Prêt à l'emploi	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Calibrateurs E2 N = 1 à 6 (cfr. valeurs exactes sur chaque flacon) dans du sérum humain et de l'azide (0,5%)	CAL	N	6 flacons 1 ml	Jaune	Prêt à l'emploi	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Solution de lavage (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 flacon 10 ml	Brun	Diluer 70x avec de l'eau distillée (utiliser un agitateur magnétique).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Contrôles - N = 1 ou 2 dans du sérum humain et du thymol	CONTROL	N	2 flacons lyophilisés	Gris	Ajouter 0.5 ml d'eau distillée	
CONTROL	N					

Note : Utiliser le calibrateur zéro pour la dilution des échantillons

VI. MATERIEL NON FOURNI

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

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

VII. PREPARATION DES REACTIFS

- A. Traceur : Transférer quantitativement la solution d'éthanol dans le tampon traceur et mélanger.
- B. Contrôles : Reconstituer les contrôles avec 0.5 ml d'eau distillée.
- C. Solution de Lavage : Préparer un volume adéquat de Solution de Lavage en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de Lavage (70x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser. Eliminer la Solution de Lavage non utilisée à la fin de la journée.

VIII. STOCKAGE ET DATE D'EXPIRATION DES REACTIFS

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

IX. PREPARATION ET STABILITE DE L'ECHANTILLON

- Les échantillons de sérum doivent être gardés entre 2 et 8°C.
- Si le test n'est pas réalisé dans les 24 heures, un stockage à -20°C est recommandé.
- Eviter des cycles de congélation et décongélation successifs.

X. MODE OPERATOIRE

A. Notes de manipulation

Ne pas utiliser la trousse ou ses composants après avoir dépassé la date d'expiration. Ne pas mélanger du matériel provenant de trousses de lots différents. Mettre tous les réactifs à température ambiante avant utilisation. Mélanger à fond tous les réactifs et les échantillons sous agitation douce. Pour éviter toute contamination croisée, utiliser une nouvelle pointe de pipette pour l'addition de chaque réactif et échantillon. Des pipettes de haute précision ou un équipement de pipetage automatique permettent d'augmenter la précision. Respecter les temps d'incubation. Préparer une courbe de calibration pour chaque nouvelle série d'expériences, ne pas utiliser les données d'expériences précédentes.

B. Mode opératoire

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

XI. CALCUL DES RESULTATS

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

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{moyennedes cpm(CAL ou échantillon)}}{\text{moyennedes cpm(CAL 0)}} \times 100$$

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

XII. DONNEES TYPES

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

E2	cpm	B/Bo (%)
Activité totale	47330	
Calibrateur		
0 pg/ml	19724	100,0
18 pg/ml	17947	91,0
35 pg/ml	14990	76,0
152 pg/ml	10995	55,7
433 pg/ml	6012	30,5
1818 pg/ml	2439	12,4
3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. PERFORMANCE ET LIMITES DU DOSAGE

A. Limite de détection

Vingt-deux calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un assortiment d’autres calibrateurs.
La limite de détection, définie comme la concentration apparente située 2 déviations standards en-dessous de la moyenne déterminée à la fixation zéro, était de 6,4 pg/ml.

B. Spécificité

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

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

C. Précision

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

SD : Déviation Standard; CV: Coefficient de variation

D. Exactitude

TEST DE DILUTION			
Dilution	Concent. Théorique (pg/ml)	Concent. Mesurée (pg/ml)	Recupération (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

L’échantillon a été dilué avec le Calibrateur zéro.

Les concentrations mesurées et théoriques étaient cohérentes:
Y (mesurées) = 0,99X (théoriques) – 27,0, R² = 0,995

TEST DE RECUPERATION				
Echantillon	E2 ajouté (pg/ml)	E2 théorique (pg/ml)	E2 mesurée (pg/ml)	Recupération (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
	3000	3013	2912	97
2	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Les concentrations mesurées et théoriques étaient cohérentes:
- Échantillons 1 : Y (mesurées) = 0,98X (théoriques) + 0,9, R² = 0,998
- Échantillons 2 : Y (mesurées) = 0,93X (théoriques) + 10,2, R² = 1,000

Facteur de conversion :

De ng/ml à nmol/L : x 3,68
De nmol/L à ng/ml : x 0,272

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

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

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

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

XIV. CONTROLE QUALITE INTERNE

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

XIV. VALEURS ATTENDUES

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

	Portée de la concentration (2,5 à 97,5% percentiles) (pg/ml)	Concentrations moyennes (pg/ml)	Nombre de sujets
Hommes normaux	15 - 47	27	59
Femmes normales			
. Phase folliculaire (jour -10 à -3)	50 – 482	137	35
. Phase préovulatoire (jour -1 & 0)	66 – 488	176	33
. Phase lutéale (jour 3 à 10)	51 – 376	119	40
. Postménopausique	6 - 53	16	72
Grossesse			
. Premier trimestre	510 - 6300		20
. Second trimestre	2400 - 18900		26
. Troisième trimestre	11900 - 37100		20

XV. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

Sécurité
Pour utilisation en diagnostic *in vitro* uniquement.
Cette trousse contient de l'¹²⁵I (demi-vie: 60 jours), une matière radioactive émettant des rayonnements ionisants X (28 keV) et γ (35.5 keV).
Ce produit radioactif peut uniquement être reçu, acheté, possédé ou utilisé par des personnes autorisées; l'achat, le stockage, l'utilisation et l'échange de produits radioactifs sont soumis à la législation du pays de l'utilisateur final. Ce produit ne peut en aucun cas être administré à l'homme ou aux animaux.
Toutes les manipulations radioactives doivent être exécutées dans un secteur désigné, éloigné de tout passage. Un journal de réception et de stockage des matières radioactives doit être tenu à jour dans le laboratoire. L'équipement de laboratoire et la verrerie, qui pourrait être contaminée avec des substances radioactives, doivent être isolés afin d'éviter la contamination croisée de plusieurs isotopes.
Toute contamination ou perte de substance radioactive doit être réglée conformément aux procédures de radio sécurité. Les déchets radioactifs doivent être placés de manière à respecter les réglementations en vigueur. L'adhésion aux règles de base de sécurité concernant les radiations procure une protection adéquate
Les composants de sang humain inclus dans ce kit ont été évalués par des méthodes approuvées par l'Europe et/ou la FDA et trouvés négatifs pour HBsAg, l'anti-HCV, l'anti-HIV-1 et 2. Aucune méthode connue ne peut offrir l'assurance complète que des dérivés de sang humain ne transmettront pas d'hépatite, le sida ou toute autre infection. Donc, le traitement des réactifs, du sérum ou des échantillons de plasma devront être conformes aux procédures locales de sécurité.
Tous les produits animaux et leurs dérivés ont été collectés d'animaux sains. Les composants bovins proviennent de pays où l'ESB n'a pas été détectée. Néanmoins, les composants contenant des substances animales devront être traités comme potentiellement infectieux.
L'azide de sodium est nocif s'il est inhalé, avalé ou en contact avec la peau (l'azide de sodium est utilisé comme agent conservateur). L'azide dans cette trousse pouvant réagir avec le plomb et le cuivre dans les canalisations et donner des composés explosifs, il est nécessaire de nettoyer abondamment à l'eau le matériel utilisé.

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

XVII. BIBLIOGRAPHIE

1.

ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2.

GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3.

HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4.

METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5.

PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6.

SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7.

WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. RESUME DU PROTOCOLE

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

Numéro de catalogue DIAsource : KIP0629	Numéro de P.I.: 1700461/fr	Numéro de révision : 150324/1
--	-------------------------------	----------------------------------

Vor Gebrauch des Kits lesen Sie bitte diese Packungsbeilage.

E2-RIA-CT

I. VERWENDUNGSZWECK

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

II. ALLGEMEINE INFORMATION

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

Für technische Unterstützung oder Bestellungen wenden Sie sich bitte an:

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

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

E-mail Ordering : ordering@diasource.be

III. KLINISCHER HINTERGRUND

A. Biologische Aktivität

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

B. Klinische Anwendungen

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

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

IV. GRUNDSÄTZLICHES ZUR DURCHFÜHRUNG

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

V. MITGELIEFERTE REAGENZIEN

Reagenz	96 Test Kit	Farbcode	Rekonstitution			
 Mit anti E2- beschichtete Röhrchen	2 x 48	braun	Gebrauchsfertig			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td><td>CONC</td></tr></table> Tracer : ¹²⁵ Iod markiertes E2 (HPLC grade) in Äthanollösung	Ag	¹²⁵ I	CONC	1 Gefäß 1 ml 142 kBq	rot	Übertragen Sie quantitativ die Äthanollösung in den Tracer-Puffer
Ag	¹²⁵ I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Tracer-Puffer mit Rindergelatin und Azide (<0.1%)	TRACER	BUF	1 Gefäß 53 ml	schwarz	Gebrauchsfertig	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Null-Kalibrator in Humanserum und Azid (0,5%)	CAL	0	1 Gefäß 5 ml	gelb	Gebrauchsfertig	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratoren E2 : N = 1 bis 6 (genaue Werte auf Gefäß-Etiketten) in Humanserum und Azid (0,5%)	CAL	N	6 Gefäße 1 ml	gelb	Gebrauchsfertig	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Waschlösung (TRIS-HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 Gefäß 10 ml	braun	70x mit dest. Wasser (Magnetrührer verwenden) verdünnen.
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrollen : N = 1 oder 2 in Humanserum und Thymol	CONTROL	N	2 Gefäße lyophilisiert	silber	0.5 ml dest. Wasser zugeben	
CONTROL	N					

Bemerkung : Benutzen Sie den Null-Kalibrator zur Probenverdünnung.

VI. ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

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

VII. VORBEREITUNG DER REAGENZIEN

- A. **Tracer:** Übertragen Sie quantitativ die Äthanollösung in den Tracer-Puffer und mischen Sie.
- B. **Kontrollen:** Rekonstituieren Sie die Kontrollen mit 0.5 ml dest. Wasser.
- C. **Waschlösung:** Zur Vorbereitung eines angemessenen Volumens nutzbarer Waschlösung, mischen Sie zu einem Volumen Waschlösung (70x) 69 Volumen destilliertes Wasser. Benutzen Sie einen Magnetrührer. Entsorgen Sie nach jedem Arbeitstag die überflüssige Waschlösung.

VIII. AUFBEWAHRUNG UND LAGERUNG DER REAGENZIEN

- Vor dem Öffnen und Rekonstituieren sind alle Kitkomponenten bei 2 bis 8°C bis zu dem auf dem Etikett angegebenen Verfallsdatum haltbar.

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

IX. PROBENSAMMLUNG UND -VORBEREITUNG

- Serumproben müssen bei 2-8 °C aufbewahrt werden.
- Falls der Test nicht innerhalb von 24 Std. durchgeführt wird, müssen die Porben bei -20°C aufgehoben werden.
- Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

X. DURCHFÜHRUNG

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

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

XI. BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

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

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

- Millimeterpapier (über 3 Größenordnungen) drucken Sie die (B/B0(%)) Werte für jeden Kalibratorpunkt als Funktion der E2-Konzentration für jeden Kalibratorpunkt, schließen Sie offensichtliche „Ausreißer“ aus.
- Computergestützte Methoden können ebenfalls zur Erstellung der Kalibrationskurve verwendet werden. Falls die Ergebnisberechnung mit dem Computer durchgeführt wird, empfehlen wir die Berechnung mit einer „4 Parameter“-Kurvenfunktion.
 - Bestimmen Sie die E2-Konzentrationen der Proben über Interpolation der Probenwerte B/B0(%) der Referenzkurve.
 - Bei jedem Assay muss der Prozentsatz des gesamten gebundenen Tracers ohne unmarkiertes E2 (B0/T) geprüft werden.

XII. TYPISCHE WERTE

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

E2-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Gesamtaktivität		47330	
Kalibrator	0 pg/ml	19724	100,0
	18 pg/ml	17947	91,0
	35 pg/ml	14990	76,0
	152 pg/ml	10995	55,7
	433 pg/ml	6012	30,5
	1818 pg/ml	2439	12,4
	3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. LEISTUNGSMERKMALE UND GRENZEN DER METHODIK

- A. Nachweisgrenze
- Zweiundzwanzig Null-Kalibratoren wurden zusammen mit einem Satz anderer Kalibratoren gemessen.
- Die Nachweisgrenze, definiert als die scheinbare Konzentration bei zwei Standardabweichungen unterhalb des gemessenen Durchschnittswerts bei Nullbindung, entsprach 6,4 pg/ml.

B. Spezifität

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

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

C. Präzision

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

SD : Standardabweichung; CV: Variationskoeffizient

D. Genauigkeit

VERDÜNNUNGSTEST			
Verdünnung	Theoretische Konzent. (pg/ml)	Wiedergefunden (%)	Gemessene Konzent. (pg/ml)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

Die Proben wurden mit Null Kalibrator verdünnt.

Gemessene und theoretische Konzentrationen waren konsistent:
Y (gemessene) = 0,99X (theoretische) + 27,0, R² = 0,995

WIEDERFINDUNGSTEST				
Probe	Zuggeg. E2 (pg/ml)	Theoretische E2 (pg/ml)	Wiedergef. E2 (pg/ml)	Wiedergefun den (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
	3000	3013	2912	97
2	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Gemessene und theoretische Konzentrationen waren konsistent:
Proben 1: Y (gemessene) = 0,98X (theoretische) + 0,9, R² = 0,998
Proben 2: Y (gemessene) = 0,93X (theoretische) + 10,2, R² = 1,000

Umrechnungsfaktor:

Von ng/ml in nmol/L: x 3,68
Von nmol/L in ng/ml: x 0,272

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

- E. Zeitverzögerung zwischen letzter Kalibrator- und Probenzugabe
- Es wird im folgenden gezeigt, dass die Genauigkeit der Tests selbst dann erhalten bleibt, wenn die Probe 40 Minuten nach Zugabe des Kalibrators in die beschichteten Röhrchen zugefügt wird.

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

XIV. INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

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

XV. ZU ERWARTENDER BEREICH

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

	Konzentrationsbereich (2,5 bis 97,5% Perzentile) (pg/ml)	Median (pg/ml)	Anzahl von Personen
Gesunde Männer	15 - 47	27	59
Gesunde Frauen			
· Follikelsphase (Tag -10 bis -3)	50 – 482	137	35
· Präovulationsphase (Tag -1 & 0)	66 – 488	176	33
· Lutealphase (Tag 3 bis 10)	51 – 376	119	40
· Postmenopausal	6 - 53	16	72
Schwangerschaft			
· 1. Trimester	510 - 6300		20
· 2. Trimester	2400 - 18900		26
· 3. Trimester	11900 - 37100		20

XVI. VORSICHTMASSNAHMEN UND WARNUNGEN

Sicherheit
Nur für diagnostische Zwecke.
Dieser Kit enthält ¹²⁵I (Halbwertszeit: 60 Tagen) , das ionisierende X (28 keV) und γ (35.5 keV) Strahlungen emittiert.
Dieses radioaktive Produkt kann nur an autorisierte Personen abgegeben und darf nur von diesen angewendet werden; Erwerb, Lagerung, Verwendung und Austausch radioaktiver Produkte sind Gegenstand der Gesetzgebung des Landes des jeweiligen Endverbrauchers. In keinem Fall darf das Produkt an Menschen oder Tieren angewendet werden.
Der Umgang mit radioaktiven Substanzen sollte fern von Durchgangsverkehr in einem speziell ausgewiesenen Bereich stattfinden. Ein Logbuch für Protokolle und Aufbewahrung muss im Labor sein. Die 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.
Die menschlichen Blutkomponenten in diesem Kit wurden mit europäischen und in USA erprobten FDA-Methoden getestet, sie waren negativ für HBsAg, anti-HCV und anti-HIV 1 und 2. Keine bekannte Methode kann jedoch vollkommene Sicherheit liefern, dass menschliche Blutbestandteile nicht Hepatitis, AIDS oder andere Infektionen übertragen. Deshalb sollte der Umgang mit Reagenzien, Serum oder Plasmaproben in Übereinstimmung mit den Sicherheitsbestimmungen erfolgen.
Alle tierischen Produkte und deren Derivate wurden von gesunden Tieren gesammelt. Komponenten von Rindern stammen aus Ländern in denen BSE nicht nachgewiesen wurde. Trotzdem sollten Komponenten, die tierische Substanzen enthalten, als potentiell ansteckend behandelt werden.
Vermeiden Sie Hautkontakt mit den Reagenzien (Natriumazid als Konservierungsmittel). Das Azid in diesem Kit kann mit Blei oder Kupfer in den Abflußrohren reagieren und so hochexplosive Metallazide bilden. Spülen Sie während der Waschschrte den Abfluß gründlich mit viel Wasser, um die Metallazidbildung zu verhindern.
Bitte rauchen, trinken, essen oder wenden Sie Kosmetika nicht in Ihrem Arbeitsbereich an. Pipettieren Sie nicht mit dem Mund. Tragen Sie Schutzkleidung und Wegwerfhandschuhe.

XVII. LITERATUR

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII.ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLS

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

DIAsource Katalognummer : KIP0629	Beipackzettel- nummer : 1700461/de	Nummer der Originalausgabe : 150324/1
--------------------------------------	---------------------------------------	---

Revisionsdatum: 2015-03-24

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

E2-RIA-CT

I. USO DEL KIT

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

II. INFORMAZIONI DI CARATTERE GENERALE

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

Per informazioni tecniche o su come ordinare il prodotto contattare:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMAZIONI CLINICHE

A. Attività biologica

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

B. Applicazioni cliniche

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

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

IV. PRINCIPIO DEL METODO

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

V. REATTIVI FORNITI

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

Note : Usare lo calibratore zero per diluire i campioni.

VII. REATTIVI NON FORNITI

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

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

VIII. PREPARAZIONE DEI REATTIVI

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

VIII. CONSERVAZIONE E SCADENZA DEI REATTIVI

- I reattivi non utilizzati sono stabili a 2-8°C fino alla data riportata su ciascuna etichetta.

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

IX. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

- Conservare i campioni di siero a 2-8°C.
- Se non si desidera eseguire il dosaggio entro 24 ore dal prelievo, si raccomanda di conservare i campioni a -20°C.
- Evitare ripetuti cicli di congelamento-scongelo dei campioni.

X. METODO DEL DOSAGGIO

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

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

XI. CALCOLO DEI RISULTATI

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

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

3. Usando carta semilogaritmica a 3 cicli o logit-log e ponendo in ordinata i rapporti di competizione. B/B0 (%) per ogni calibratore e in ascissa le rispettive concentrazioni di E2, tracciare la curva di taratura, scartare i valori palesemente discordanti.
4. È possibile utilizzare un sistema di interpolazione dati automatizzato. Con un sistema automatico di interpolazione dati, utilizzare la curva a 4 parametri.
5. Per interpolazione sulla curva di taratura dei rapporti di competizione di campioni e controlli, determinare le rispettive concentrazioni di E2.
6. Per ogni dosaggio determinare la capacità legante B0/T.

XII. CARATTERISTICHE TIPICHE

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

E2-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Attività totale		47330	
Calibratore	0 pg/ml	19724	100,0
	18 pg/ml	17947	91,0
	35 pg/ml	14990	76,0
	152 pg/ml	10995	55,7
	433 pg/ml	6012	30,5
	1818 pg/ml	2439	12,4
	3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. CARATTERISTICHE E LIMITI DEL METODO

A. Sensibilità

Venti due a zero calibratori sono stati analizzati insieme a una serie di altri calibratori.
La sensibilità, calcolata come concentrazione apparente di un campione con cpm pari alla media meno 2 deviazioni calibratore di 20 replicati dello calibratore zero, è risultata essere 6,4 pg/ml.

B. Specificità

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

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

C. Precisione

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

SD : Deviazione Standard; CV: Coefficiente di Variazione

D. Accuratezza

TEST DI DILUIZIONE

Diluizione	Concentrazione teorica (pg/ml)	Concentrazione misurata (pg/ml)	Recupero (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

I campioni sono stati diluiti con calibratore zero.

Concentrazioni misurate e teoriche sono stati coerenti:
Y (misurate) = 0,99X (teoriche) + 27,0, R² = 0,995

TEST DI RECUPERO

Campione	E2 aggiunto (pg/ml)	E2 teorica (pg/ml)	E2 misurata (pg/ml)	Recupero (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
2	3000	3013	2912	97
	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Concentrazioni misurate e teoriche sono stati coerenti:
Campioni 1: Y (misurate) = 0,98X (teoriche) + 0,9, R² = 0,998
Campioni 2: Y (misurate) = 0,93X (teoriche) + 10,2, R² = 1,000

Fattore di conversione:

Da ng/ml a nmol/l: x 3,68
Da nmol/l a ng/ml : x 0,272

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

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

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

TEMPO TRASCORSO

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

XIV. CONTROLLO DI QUALITÀ INTERNO

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

XV. INTERVALLI DI RIFERIMENTO

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

	Intervallo di concentrazione (2,5 - 97,5% percentili) (pg/ml)	Mediana (pg/ml)	Numero di soggetti
Maschi normali	15 - 47	27	59
Femmine normali			
. Fase follicolare (giorno da -10 a -3)	50 - 482	137	35
. Fase preovulatoria (giorno -1 & 0)	66 - 488	176	33
. Fase luteale (giorno da 3 a 10)	51 - 376	119	40
. Postmenopausa	6 - 53	16	72
Gravidanza			
. Primo trimestre	510 - 6300		20
. Secondo trimestre	2400 - 18900		26
. Terzo trimestre	11900 - 37100		20

XVI. PRECAUZIONI PER L'USO

Sicurezza
Il kit è solo per uso diagnostico in vitro.
Il kit contiene ¹²⁵I (emivita: 60 giorni) emettente raggi X (28 keV) e γ (35.5 keV) ionizzanti.
L'acquisto, la detenzione, l'utilizzo e il trasporto di materiale radioattivo sono soggetti a regolamentazione locale. In nessun caso il prodotto può essere somministrato ad esseri umani o animali. Usare sempre guanti e camici da laboratorio quando si manipola materiale radioattivo. Le sostanze radioattive devono essere conservate in propri contenitori in appositi locali che devono essere interdetti alle persone non autorizzate. Deve essere tenuto un registro di carico e scarico del materiale radioattivo. Il materiale di laboratorio e la vetreria deve essere dedicato all'uso di isotopi specifici per evitare cross-contaminazioni. In caso di contaminazione o dispersione di materiale radioattivo, fare riferimento alle norme locali di radioprotezione. I rifiuti radioattivi devono essere smaltiti secondo le norme locali di radioprotezione. Lo scrupoloso rispetto delle norme per l'uso di sostanze radioattive fornisce una protezione adeguata agli utilizzatori. I reattivi di origine umana presenti nel kit sono stati dosati con metodi approvati da organismi di controllo europei o da FDA e si sono rivelati negativi per HBs Ag, anti HCV, anti HIV1 e anti HIV2. Non sono disponibili metodi in grado di offrire la certezza assoluta che derivati da sangue umano non possano provocare epatiti, AIDS o trasmettere altre infezioni. Manipolare questi reattivi o i campioni di siero o plasma secondo le procedure di sicurezza vigenti. Tutti i prodotti di origine animale o loro derivati provengono da animali sani. I componenti di origine bovina provengono da paesi dove non sono stati segnalati casi di BSE. E' comunque necessario considerare i prodotti di origine animale come potenziali fonti di infezioni. Evitare ogni contatto dell'epidermide con i reattivi contenenti sodio azide come conservante. La sodio azide può reagire con piombo rame o ottone presenti nelle tubature di scarico per formare metallo-azidi esplosive. Smaltire questi reattivi facendo scorrere abbondante acqua negli scarichi. Nei luoghi dove si usano sostanze radioattive non è consentito consumare cibi o bevande, fumare o usare cosmetici. Non pipettare i reattivi con pipette a bocca.

XVII. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil.andSteril.46,5,823-827

4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. SCHEMA DEL DOSAGGIO

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

Numero di catalogo di DIAsource : KIP0629	P.I. numero : 1700461/it	Revisione numero : 150324/1
--	-----------------------------	--------------------------------

Data di revisione: 2015-03-24

Leer el protocolo completo antes de usar.

E2-RIA-CT

I. INSTRUCCIONES DE USO

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

II. INFORMACIÓN GENERAL

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

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

III. INFORMACIÓN CLÍNICA

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

IV. PRINCIPIOS DEL MÉTODO

Una cantidad fija de esteroide marcada con I¹²⁵ compite con el esteroide a medir, presente en la muestra ó en el calibrador, por los puntos de unión del anticuerpo inmovilizado en las paredes de un tubo de poliestireno. No se necesita ni extracción ni cromatografía debido a la alta especificidad de los anticuerpos que recubren Después de 3 horas de incubación a 37°C en baño de agua, una aspiración termina con la reacción de competición. Los tubos se lavan con 3 ml de Solución de lavado y se aspiran otra vez. Se dibuja la curva de calibración y las concentraciones de E2 de las muestras se determinan por interpolación de la dosis en la curva de calibración

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

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

Nota: Para diluciones de muestras utilizar calibrador cero.

VI. MATERIAL NO SUMINISTRADO

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

1. Agua destilada
2. Pipetas de 50µl y 500µl (Se recomienda el uso de pipetas precisas con puntas desechables de plástico)
3. Vortex
4. Agitador magnético
5. Baño de agua a 37°C
6. Jeringa automática 5 ml (tipo Cornwall) para el lavado
7. Sistema de aspiración (opcional)
8. Contador de radiaciones gamma para medir I¹²⁵ (mínima eficiencia 70%)

VII. PREPARACIÓN REACTIVOS

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

VIII. ALMACENAJE Y CADUCIDADES DE LOS REACTIVOS

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

IX. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

- Las muestras de suero deben ser guardadas a 2-8°C.
- Si el ensayo no se realiza en 24 hrs., almacenar las muestras a –20°.
- Evitar congelar y descongelar sucesivamente.

X. PROTOCOLO

- A. **Notas de manejo**
No utilizar el kit ó componentes después de la fecha de caducidad. No mezclar reactivos de diferente número de lote. Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.
Agitar minuciosamente todos los reactivos y muestras, agitándolos o girándolos suavemente. Con el fin de evitar contaminación utilizar puntas de pipetas desechables y limpias para la adición de cada reactivo y muestra.
El uso de pipetas de precisión ó equipamiento de dispensación automática mejorara la precisión. Respetar los tiempos de incubación.
Preparar la curva de calibración en cada ensayo, no utilizar los datos de un ensayo previo.

- B. **Protocolo**
1. Marcar los tubos recubiertos por duplicado para cada unos de los estándares, muestras y controles. Para la determinación de las Cuentas Totales, marcar 2 tubos normales.
 2. Agitar brevemente los calibradores, muestras y controles y dispensar 50 µl de cada uno en sus respectivos tubos.
 3. Dispensar 500 µl de E2 marcado con I¹²⁵ en cada tubo, incluyendo los tubos no recubiertos a las Cuentas Totales.
 4. Agitar suavemente la gradilla de tubos para soltar cualquier burbuja cautiva en las paredes de los tubos.
 5. Incubar durante 3 horas a 37°C en baño de agua.
 6. Aspirar el contenido de cada tubo (excepto los de Cuentas Totales). Asegurarse que la punta de la pipeta de aspiración toca el fondo del tubo con el fin de aspirar todo el líquido.
 7. Lavar los tubos con 3 ml de Solución de lavado de trabajo (excepto los de Cuentas Totales) y aspirar. Evitar la formación de espuma durante la adición de la Solución de lavado
 8. Dejar los tubos en posición inversa durante 2 minutos y aspirar el líquido restante.
 9. Medir la actividad de cada tubo durante 60 segundos en un Contador Gamma.

XI. CALCULO DE RESULTADOS

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

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

3. Utilizando papel 3 ciclo semilogarítmico ó logit-log, representar los valores de (B/B0%) de cada calibrador frente a las concentraciones del E2 de cada calibrador, rechazando los extremos claros.
4. Métodos computarizados de computación de resultados pueden ser utilizados para la construcción de la curva de calibración. Si se utiliza un sistema automático de cálculo de resultados, se recomienda usar la representación gráfica “ 4 parámetros”.
5. Por interpolación de los valores (B/B%) de las muestras, se determinan los valores de las concentraciones de las mismas desde la curva de calibración.
6. El porcentaje total de enlace del trazador en ausencia de E2 no marcado (B0/T) debe ser calculado en cada ensayo.

XII. EJEMPLO DE RESULTADOS

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

E2-RIA-CT		cpm	B/Bo (%)
Cuentas Totales		47330	
Calibrador	0 pg/ml	19724	100,0
	18 pg/ml	17947	91,0
	35 pg/ml	14990	76,0
	152 pg/ml	10995	55,7
	433 pg/ml	6012	30,5
	1818 pg/ml	2439	12,4
	3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. REALIZACIÓN Y LIMITACIONES

A. Limite de detección

Veinte dos calibradores cero fueron medidos en una curva con otros calibradores. El límite de detección, definido como la concentración aparente resultante de dos desviaciones estándares debajo de la media de enlace del calibrador cero, fue de 6,4 pg/ml.

B. Especificidad

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

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

C. Precisión

INTRA-ASSAY PRECISION

INTER-ASSAY PRECISION

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

SD : Desviación Estándar; CV: Coeficiente de Variación

D. Exactitud

TEST DILUCIÓN			
Dilución	Concent. Teórica (pg/ml)	Concent. Medida (pg/ml)	Recuperado (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

Las muestras fueron diluidas con el Calibrador cero.

Concentraciones medidas y teóricos fueron consistentes:
Y (medidas) = 0,99X (teóricos) + 27,0, R² = 0,995

TEST DE RECUPERACIÓN				
Muestra	E2 añadido (pg/ml)	E2 Teórica (pg/ml)	E2 Medida (pg/ml)	Recuperado (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
2	3000	3013	2912	97
	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Concentraciones medidas y teóricos fueron consistentes:
Muestras 1: Y (medidas) = 0,98X (teóricos) + 0,9, R² = 0,998
Muestras 2: Y (medidas) = 0,93X (teóricos) + 10,2, R² = 1.000

Factor de conversión:

De ng/ml a nmol/L : x 3,68
De nmol/L a ng/ml : x 0,272

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

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

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

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

XIV. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

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

XV. INTERVALOS DE REFERENCIA

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

	Rango de concentración (2.5 a 97.5% percentiles) (pg/ml)	Concentración promedio (pg/ml)	Número de sujetos
Hombres Normales	15 - 47	27	59
Mujeres Normales			
. Fase folicular (día -10 a 3)	50 – 482	137	35
. Fase pre ovulatoria (día -1 & 0)	66 – 488	176	33
. Fase lútea (día 3 a 10)	51 – 376	119	40
. Post menopáusica	6 - 53	16	72
Embarazo			
. Primer trimestre	510 - 6300		20
. Segundo trimestre	2400 - 18900		26
. Tercer trimestre	11900 - 37100		20

XVI. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Seguridad
Para uso solo en diagnóstico in vitro.
Este kit contiene I¹²⁵ (vida media : 60 días) emisor de rayos X (28 keV) y de rayos γ (35.5 keV) ionizantes.
Este producto radiactivo solo puede ser manejado y utilizado por personas autorizadas; la compra, almacenaje, uso y cambio de productos radiactivos están sujetos a la legislación del país del usuario. En ningún caso el producto deberá ser suministrado a humanos y animales.
Todo el manejo de producto radiactivo se hará en un área señalizada, diferente de la de paso regular. Deberá de utilizarse un libro de registros de productos radiactivos utilizados. El material de laboratorio, vidrio que podría estar contaminado radiactivamente deberá de descontaminarse para evitar la contaminación con otros isótopos.
Cualquier derramamiento radiactivo deberá ser limpiado de inmediato de acuerdo con los procedimientos de seguridad. Los desperdicios radiactivos deberán ser almacenados de acuerdo con las regulaciones y normativas vigentes de la legislación a la cual pertenezca el laboratorio. El ajustarse a las normas básicas de seguridad radiológica facilita una protección adecuada.
Los componentes de sangre humana utilizados en este kit han sido testados por métodos aprobados por la CEE y/o la FDA dando negativo a HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 y 2. No se conoce ningún método que asegure que los derivados de la sangre humana no transmitan hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto el manejo de los reactivos y muestras se hará de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales.
Todos los productos animales y derivados han sido obtenidos a partir de animales sanos. Componentes bovinos originales de países donde BSE no ha sido informado. Sin embargo, los componentes conteniendo sustancias animales deberán ser considerados como potencialmente infecciosos.
Evitar cualquier contacto de los reactivos con la piel (azida sódica como conservante). La azida en este kit puede reaccionar con el plomo y cobre de las cañerías y producir azidas metálicas altamente explosivas. Durante el proceso de lavado, hacer circular mucha cantidad de agua por el sumidero para evitar el almacenamiento de la azida.
No fumar, beber, comer ó utilizar cosméticos en el área de trabajo. No pipetear con la boca. Utilizar ropa de protección y guantes.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1.

ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2.

GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3.

HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4.

METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5.

PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6.

SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7.

WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. RESUMEN DEL PROTOCOLO

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

DIAsource Catalogo Nr: KIP0629	P.I. Numero : 1700461/es	Revisión nr: 150324/1
-----------------------------------	-----------------------------	--------------------------

Fecha de la revisión: 2015-03-24

Διαβάστε ολόκληρο το πρωτόκολλο πριν από τη χρήση.

E2-RIA-CT

I. ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΠΟΙΑ ΠΡΟΟΡΙΖΕΤΑΙ

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

II. ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

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

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

III. ΚΛΙΝΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ

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

IV. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

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

V. ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Αντιδραστήρια	Κιτ 96 προδιο- ρισμών	Χρωμα- τικός κωδικός	Ανασύσταση
Σωληνάρια επιστρωμένα με αντι E2	2 x 48	καφέ	Έτοιμο για χρήση
Ag ¹²⁵I CONC ΙΧΝΗΘΕΤΗΣ: E2 σημασμένη με ²¹²⁵Ιωδίνη (τύπου HPLC) σε διάλυμα αιθανόλης	1 φιαλίδιο 1 ml 142 kBq	κόκκινο	Ποσοτική μεταφορά του διαλύματος αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα του ιχνηθέτη
TRACER BUF Ρυθμιστικό διάλυμα ιχνηθέτη με βόεια ζελατίνη και αζίδιο (<0,1%)	1 φιαλίδιο 53 ml	μαύρο	Έτοιμο για χρήση
CAL 0 Μηδενικός βαθμονομητής σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	1 φιαλίδιο 5 ml	κίτρινο	Έτοιμο για χρήση
CAL N Βαθμονομητές E2 N = 1 έως 6 (δείτε τις ακριβείς τιμές στις ετικέτες των φιαλιδίων) σε ανθρώπινο ορό και αζίδιο (0,5%)	6 φιαλίδια 1 ml	κίτρινο	Έτοιμο για χρήση
WASH SOLN CONC Διάλυμα πλύσης (TRIS-HCl)	1 φιαλίδιο 10 ml	καφέ	Αραιώστε 70 x με απεσταγμένο νερό (χρησιμοποιήστε μαγνητικό αναδευτήρα).
CONTROL N Οροί ελέγχου - N = 1 ή 2 σε ανθρώπινο ορό και θυμόλη	2 φιαλίδια λυοφιλο- ποιη- μένο	ασημί	Προσθέστε 0.5 ml απεσταγμένου νερού

Σημείωση: Χρησιμοποιείτε το μηδενικό βαθμονομητή για αραιώσεις δειγμάτων.

VI. ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ ΠΟΥ ΔΕΝ ΠΑΡΕΧΟΝΤΑΙ

Τα ακόλουθα υλικά απαιτούνται αλλά δεν παρέχονται στο κιτ:

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

VII. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΟΥ

A. Ιχνηθέτης: **Μεταφέρετε ποσοτικά** το διάλυμα αιθανόλης στο ρυθμιστικό διάλυμα του ιχνηθέτη και αναμείξτε.

B. **Οροί ελέγχου:** Ανασυστήστε τους ορούς ελέγχου με 0.5 ml απεσταγμένου νερού.

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

VIII. ΦΥΛΑΞΗ ΚΑΙ ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΛΗΞΗΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΩΝ

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

IX. ΣΥΛΛΟΓΗ ΚΑΙ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

- Τα δείγματα ορού πρέπει να φυλάσσονται σε θερμοκρασία 2-8° C.
- Εάν η εξέταση δεν πραγματοποιηθεί εντός 24 ωρών, συνιστάται η φύλαξη σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης στους -20° C.
- Αποφεύγετε τη διαδοχική κατάψυξη και απόψυξη.

X. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

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

B. Διαδικασία

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

XI. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

- Υπολογίστε τη μέση τιμή των διπλών προσδιορισμών.
- Υπολογίστε τη δεσμευμένη ραδιενέργεια ως ποσοστό της δέσμευσης που προσδιορίζεται στο σημείο μηδενικού βαθμονομητή (0) σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:
$$B / B0(\%) = \frac{\text{Κρούσεις (ΒΒαθμονομητής ή δείγμα)}}{\text{Κρούσεις (ΜΜηδενικβαθμονομητής)}} \times 100$$
- Με χρήση ημιλογαριθμικού χαρτιού γραφήματος ή χαρτιού γραφήματος logit-log 3 κύκλων, παραστήστε γραφικά τις τιμές (B/B0(%)) για κάθε

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

XII. ΤΥΠΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

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

E2-RIA-CT	cpm	B/B0 (%)
Κρούσεις του ιχνηθέτη ¹²⁵ I ("total")	47330	
Βαθμονομητής		
0 pg/ml	19724	100,0
18 pg/ml	17947	91,0
35 pg/ml	14990	76,0
152 pg/ml	10995	55,7
433 pg/ml	6012	30,5
1818 pg/ml	2439	12,4
3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. ΑΠΟΔΟΣΗ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

- A. Όριο ανίχνευσης
- Μετρήθηκαν Είκοσι δύο βαθμονομητές μαζί με ένα σύνολο άλλων βαθμονομητών. Το όριο ανίχνευσης, οριζόμενο ως η φαινομενική συγκέντρωση δύο τυπικών αποκλίσεων κάτω από τις μέσες μετρήσεις σε μηδενική δέσμευση, ήταν 6,4 pg/ml.

- B. Ειδικότητα

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

Ένωση	Διασταυρούμενη αντίδραση (%)
Οιστρόνη	1,0
Οιστριόλη	0,6
Αιθυνυλοιστραδιόλη	0,2
Προγεστερόνη	<0,0002
Τεστοστερόνη	<0,2
Ανδροστενοδιόνη	<0,001
DHEA-θειικό	<0,0002
17-γλυκουρονιδική οιστραδιόλη	<0,2
Κορτιζόλη	<0,001
Equilin	<0,1
17-βαλεριανική οιστραδιόλη	<0,1
Νοργεστρέλη	<0,0004
Ανδροστενδιόλη	0,001

- Γ. Ακρίβεια

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

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

- Δ. Ορθότητα

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΡΑΙΩΣΗΣ			
Αραίωση	Θεωρητική συγκέντρωση (pg/ml)	Μετρούμενη συγκέντρωση (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

Μετρημένη και θεωρητικές συγκεντρώσεις ήταν συνεπής: Y (μετρημένη) = 0,99X (θεωρητικές) + 27,0, R² = 0,995

Τα δείγματα αραιώθηκαν με το μηδενικό βαθμονομητή.

ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΑΝΑΚΤΗΣΗΣ				
Δείγμα	Προστεθείσα E2 (pg/ml)	Θεωρητική E2 (pg/ml)	Μετρούμενη E2 (pg/ml)	Ανακτηθείσα (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
	3000	3013	2912	97
2	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Μετρημένη και θεωρητικές συγκεντρώσεις ήταν συνεπής: Δείγματα 1: Y (μετρημένη) = 0,98X (θεωρητικές) + 0,9, R² = 0,998
Δείγματα 2: Y (μετρημένη) = 0,93X (θεωρητικές) + 10,2, R² = 1,000

Συντελεστής μετατροπής:

Από ng/ml σε nmol/l: x 3,68
Από nmol/l σε ng/ml: x 0,272

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

- E. Μεσοδιάστημα μεταξύ της διανομής τελευταίου βαθμονομητή και δείγματος

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

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

XIV. ΕΣΩΤΕΡΙΚΟΣ ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

- Εάν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται για τον ορό ελέγχου 1 ή/και τον ορό ελέγχου 2 δε βρίσκονται εντός του πεδίου τιμών που καθορίζεται στην ετικέτα του φιαλιδίου, τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν, εκτός εάν έχει δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την ασυμφωνία.
- Εάν είναι επιθυμητό, κάθε εργαστήριο μπορεί να δημιουργήσει τα δικά του μείγματα δειγμάτων ελέγχου (pools), τα οποία πρέπει να διατηρούνται κατεψυγμένα σε κλάσματα/δόσεις μιας χρήσης.
- Τα κριτήρια αποδοχής για τη διαφορά μεταξύ των διπλών αποτελεσμάτων των δειγμάτων θα πρέπει να βασίζονται σε ορθές εργαστηριακές πρακτικές.

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

	Πεδίο τιμών συγκέντρωσης (ποσοστά επί τοις εκατό 2,5 έως 97,5%) (pg/ml)	Διάμεσος (pg/ml)	Αριθμός ατόμων
Φυσιολογικοί άνδρες	15 - 47	27	59
Φυσιολογικές γυναίκες			
. Ωοθυλακική φάση (ημέρα –10 έως –3)	50 – 482	137	35
. Προωορρηξιακή φάση: (ημέρα –1 & 0)	66 – 488	176	33
. Ωχρινική φάση (ημέρα 3 έως 10)	51 – 376	119	40
.Μετεμμηνοπαυσιακές	6 - 53	16	72
Κύηση			
. Πρώτο τρίμηνο	510 - 6300		20
. Δεύτερο τρίμηνο	2400 - 18900		26
. Τρίτο τρίμηνο	11900 - 37100		20

XVI. ΠΡΟΦΥΛΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΕΙΔΟΠΟΙΗΣΕΙΣ

Ασφάλειας

Μόνο για διαγνωστική χρήση in vitro.
Το kit αυτό περιέχει το ¹²⁵I (Χρόνος ημιζωής: 60 ημέρες), μια ραδιενεργή ουσία η οποία εκπέμπει ιονίζουσα ακτινοβολία Χ (28 keV) και γ (35.5 keV).
Αυτό το ραδιενεργό προϊόν είναι δυνατό να μεταφερθεί και να χρησιμοποιηθεί μόνο από εξουσιοδοτημένα άτομα. Η αγορά, φύλαξη, χρήση και ανταλλαγή ραδιενεργών προϊόντων υπόκεινται στη νομοθεσία της χώρας του τελικού χρήστη. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να χορηγείται το προϊόν σε ανθρώπους ή ζώα.
Όλος ο χειρισμός του ραδιενεργού υλικού θα πρέπει να εκτελείται σε καθορισμένο χώρο, μακριά από χώρους τακτικής διέλευσης. Στο εργαστήριο πρέπει να διατηρείται ημερολόγιο για την παραλαβή και τη φύλαξη ραδιενεργών υλικών. Εξοπλισμός και γυάλινα σκεύη του εργαστηρίου, τα οποία θα μπορούσαν να μολυνθούν με ραδιενεργές ουσίες, θα πρέπει να φυλάσσονται σε ξεχωριστό χώρο για την πρόληψη επιμόλυνσης των διαφόρων ραδιοϊσοτόπων.
Τυχόν διαρροές ραδιενεργών υγρών πρέπει να καθαρίζονται αμέσως σύμφωνα με τις διαδικασίες ασφάλειας από ραδιενέργεια. Τα ραδιενεργά απόβλητα πρέπει να απορρίπτονται σύμφωνα με τους τοπικούς κανονισμούς και τις κατευθυντήριες οδηγίες των αρχών που έχουν δικαιοδοσία στο εργαστήριο. Η τήρηση των βασικών κανόνων ασφάλειας από ραδιενέργεια παρέχει επαρκή προστασία.
Τα συστατικά ανθρώπινου αίματος που περιλαμβάνονται στο kit αυτό έχουν ελεγχθεί με μεθόδους εγκεκριμένες στην Ευρώπη ή/και από τον FDA και έχει διαπιστωθεί ότι είναι αρνητικά ως προς την παρουσία HBsAg, αντι-HCV, αντι-HIV-1 και 2. Καμία γνωστή μέθοδος δεν είναι δυνατό να παρέχει πλήρη διασφάλιση ότι παράγωγα του ανθρώπινου αίματος δε θα μεταδώσουν ηπατίτιδα, AIDS ή άλλες λοιμώξεις. Επομένως, ο χειρισμός αντιδραστηρίων, δειγμάτων ορού ή πλάσματος θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις τοπικές διαδικασίες περί ασφάλειας.
Όλα τα ζωικά προϊόντα και παράγωγα έχουν συλλεχθεί από υγιή ζώα. Τα βόεια συστατικά προέρχονται από χώρες όπου δεν έχει αναφερθεί BSE. Παρ' όλ' αυτά, συστατικά που περιέχουν ζωικές ουσίες θα πρέπει να αντιμετωπίζονται ως δυνητικά μολυσματικά.
Αποφεύγετε οποιαδήποτε επαφή του δέρματος με αντιδραστήρια (χρησιμοποιείται αζίδιο του νατρίου ως συντηρητικό). Το αζίδιο στο kit αυτό ενδέχεται να αντιδράσει με μολύβδο και χαλκό των υδραυλικών σωληνώσεων και να σχηματίσει με τον τρόπο αυτό ιδιαίτερα εκρηκτικά αζίδια μετάλλων. Κατά τη διάρκεια του βήματος πλύσης, εκπλύνετε την αποχέτευση με μεγάλη ποσότητα νερού, για την πρόληψη τυχόν συσσώρευσης αζιδίου.
Μην καπνίζετε, μην πίνετε, μην τρώτε και μη χρησιμοποιείτε καλλυντικά στο χώρο εργασίας. Μην διανέμετε με πιπέτα χρησιμοποιώντας το στόμα σας. Χρησιμοποιείτε προστατευτικό ρουχισμό και γάντια μιας χρήσης.

XVII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2. GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3. HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4. METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5. PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6. SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transforma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7. WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

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

Αρ. καταλόγου DIAsource: KIP0629	Αριθμός P.I.: 1700461/e1	Αρ. αναθεώρησης: 150324/1
-------------------------------------	-----------------------------	------------------------------

Przed zastosowaniem należy przeczytać cały protokół.

E2-RIA-CT

I. PRZEZNACZENIE

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

II. INFORMACJE OGÓLNE

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

Dział pomocy technicznej oraz informacje dotyczące zamówień:

Tel: +32 (0)10 84.99.11

Fax: +32 (0)10 84.99.91

III. INFORMACJE KLINICZNE

A. Aktywność biologiczna

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

B. Zastosowania kliniczne

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

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

IV. ZAGADNIENIA DOTYCZĄCE METODY

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

V. ODCZYNNIKI DOSTARCZONE

Odczynniki	Zestaw 96 oznaczeń	Kolor	Rekonstytucja			
 Probówki opłaskane anty-E2	2 x 48	brązowy	Gotowe do zastosowania.			
<table border="1"><tr><td>Ag</td><td>¹²⁵I</td><td>CONC</td></tr></table> ZNACZNIK IZOTOPOWY: E2 oznakowany jodem ¹²⁵ (poziom HPLC) w roztworze etanolu	Ag	¹²⁵ I	CONC	1 fiołka 1 ml 142 kBq	czerwony	Przenieść ilościowo roztwór etanolu do buforu znacznikowego
Ag	¹²⁵ I	CONC				
<table border="1"><tr><td>TRACER</td><td>BUF</td></tr></table> Bufor znacznikowy z żelatyną bydlęcą i azydkiem (<0.1%)	TRACER	BUF	1 fiołka 53 ml	czarny	Gotowe do zastosowania	
TRACER	BUF					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table> Kalibrator zerowy w ludzkiej surowicy z dodatkiem azydu (0,5%)	CAL	0	1 fiołka 5 ml	żółty	Gotowe do zastosowania	
CAL	0					
<table border="1"><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table> Kalibratory E2 N = od 1 do 6 (dokładne wartości na etykietach fiolek w ludzkiej surowicy z dodatkiem azydu (0,5%))	CAL	N	6 fiołek 1 ml	żółty	Gotowe do zastosowania	
CAL	N					
<table border="1"><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table> Roztwór płuczący (TRIS HCl)	WASH	SOLN	CONC	1 fiołka 10 ml	brązowy	Rozcieńczyć 70x wodą destylowaną (wykorzystać mieszadło magnetyczne).
WASH	SOLN	CONC				
<table border="1"><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table> Kontrolne - N = od 1 do 2 w surowicy ludzkiej z tymolem	CONTROL	N	2 fiołki materiał liofilizowa ny	srebrny	Dodać 0.5 ml wody destylowanej	
CONTROL	N					

Uwaga: Do rozcieńczeń próbek należy stosować kalibrator zerowy.

VI. MATERIAŁY WYMAGANE, ALE NIEDOSTARCZONE

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

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

VII. PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

- Znacznik** : Przenieść ilościowo roztwór etanolu do buforu znacznikowego i wymieszać.
- Kontrolne**: Kontrolne należy rekonstruować przy pomocy 0.5 ml wody destylowanej.
- Roboczy roztwór płuczący**: Właściwą objętość roboczego roztworu płuczącego należy przygotować dodając 69 objętości wody destylowanej do 1 objętości roztworu płuczącego (70x). Do homogenizacji należy wykorzystać mieszadło magnetyczne. Niewykorzystany roboczy roztwór płuczący należy wylać pod koniec dnia.

VIII. PRZECHOWYWANIE I DATA WAŻNOŚCI ODCZYNNIKÓW

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

IX. POBIERANIE I PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADANIA

- Próbki surowicy muszą być przechowywane w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$.
- Jeżeli oznaczenie nie jest wykonywane w ciągu 24 godzin, zaleca się przechowywanie w niewielkich ilościach w temperaturze -20°C .
- Unikać powtarzanych cykli zamrażania-odmrażania.

X. PROCEDURA

A. Uwagi dotyczące obsługi

Nie wolno wykorzystywać składników zestawu po upływie daty ważności.

Nie wolno mieszać materiałów pochodzących z różnych serii zestawów. Przed wykorzystaniem wszystkie odczynniki powinny osiągnąć temperaturę pokojową.

Wszystkie odczynniki i próbki należy dokładnie wymieszać przez delikatne potrząsanie lub obracanie.

Aby uniknąć zanieczyszczenia krzyżowego, do dodawania poszczególnych odczynników i próbek należy wykorzystywać czyste końcówki jednorazowe pipet. Pipety wysokiej precyzji lub pipety automatyczne poprawiają precyzję wykonania oznaczenia. Przestrzegać czasów inkubacji.

Przygotować krzywą kalibracyjną dla każdego cyklu pomiarowego, nie wolno wykorzystywać danych z poprzednich oznaczeń.

B. Procedura

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

XI. OBLICZANIE WYNIKÓW

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

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

- Na 3 arkuszach półlogarytmicznych lub papierze milimetrowym wykreślić wartości $(B/B_0(\%))$ dla każdego punktu kalibratora jako funkcję stężenia E2 każdego punktu kalibratora. Odrzucić oczywiste wartości graniczne.
- Do opracowania krzywej kalibracyjnej mogą być wykorzystane również metody wspomaganie komputerowego. Jeżeli ma być zastosowane

- automatyczne przetwarzanie wyników, zaleca się dopasowanie krzywej logistycznej 4 parametrowej.
5. Nakładając wartości (B/B0 (%)) próbki należy określić stężenia E2 w próbkach z krzywej kalibracyjnej.
6. Dla każdego oznaczenia należy sprawdzić odsetek całkowitego związanego znacznika izotopowego przy braku nieoznakowanego E2 (B0/T).

XII. PRZYKŁAD DANYCH TYPOWYCH

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

E2-RIA-CT	cpm	B/Bo (%)
Zliczanie całkowite	47330	
Kalibrator		
0 pg/ml	19724	100,0
18 pg/ml	17947	91,0
35 pg/ml	14990	76,0
152 pg/ml	10995	55,7
433 pg/ml	6012	30,5
1818 pg/ml	2439	12,4
3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. DZIAŁANIE I OGRANICZENIA

A. Granica wykrywania

Dwadzieścia dwa kalibratorów zerowych oznaczano wraz z zestawem innych kalibratorów.

Granica wykrywania, zdefiniowana jako odmienne stężenie dwóch odchyleń standardowych poniżej przeciętnej wartości zliczania przy wiązaniu zerowym kształtowała się na poziomie 6,4 pg/ml.

B. Swoistość

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

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

C. Precyzja

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

SD: Odchylenie standardowe; CV: Współczynnik zmienności

D. Dokładność

BADANIE ROZCIEŃCZENIA			
Rozcieńczenie	Stęż. teoretyczne (pg/ml)	Stęż. mierzone (pg/ml)	Odzysk (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

Próbki zostały rozcieńczone przy pomocy kalibrator zerowy.

Mierzone i teoretyczne stężenia były zgodne:
Y (mierzone) = 0,99X (teoretyczne) + 27,0, R² = 0,995

BADANIE ODZYSKU				
Próbka	Dodano E2 (pg/ml)	Teoretyczne E2 (pg/ml)	Mierzone E2 (pg/ml)	Odzysk (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
	3000	3013	2912	97
2	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Mierzone i teoretyczne stężenia były zgodne:
Próbki 1: Y (mierzone) = 0,98X (teoretyczne) + 0,9, R² = 0,998
Próbki 2: Y (mierzone) = 0,93X (teoretyczne) + 10,2, R² = 1,000

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

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

E. Opóźnienie pomiędzy oznaczeniem ostatniego kalibratora i dozowaniem próbki

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

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

XIV. WEWNĘTRZNA KONTROLA JAKOŚCI

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

XV. ZAKRESY REFERENCYJNE

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

	Zakres stężenia (percentylach od 2,5% do 97,5%.) (pg/ml)	Mediana stężenie (pg/ml)	Liczba osobników
Zdrowi mężczyźni	15 - 47	27	59
Zdrowe kobiety			
· Faza follikularna (dzień cyklu od -10 do -3)	50 – 482	137	35
· Faza przedowulacyjna (dzień cyklu -1 i 0)	66 – 488	176	33
· Faza lutealna (dzień od 3 do 10)	51 – 376	119	40
· Okres pomenopauzalny	6 - 53	16	72
Ciąży			
· Pierwszy trymestr	510 - 6300		20
· Drugi trymestr	2400 - 18900		26
· Trzeci trymestr	11900 - 37100		20

XVI. ŚRODKI OSTROŻNOŚCI I OSTRZEŻENIA

Bezpieczeństwo

Tylko do diagnostyki *in vitro*.
Zestaw zawiera ¹²⁵I (Okres połowicznego rozpadu: 60 dni), emitujący promieniowanie jonizujące X (28 keV) i γ (35,5 keV).
Ten produkt radioaktywny może być transportowany i wykorzystany wyłącznie przez osoby autoryzowane; zakup, przechowywanie, stosowanie i wymiana produktów radioaktywnych podlega regulacjom prawnym kraju użytkownika końcowego. W żadnym wypadku produkt nie może być podawany ludziom lub zwierzętom.
Obsługa materiałów radioaktywnych powinno być przeprowadzana w miejscach do tego przeznaczonych, z dala od miejsc ogólnej użyteczności. W laboratorium musi być przechowywany rejestr przyjęć i przechowywania materiałów radioaktywnych. Wyposażenie laboratorium oraz szkło, które może być skażone substancjami radioaktywnymi powinno być oddzielone w celu uniknięcia krzyżowego zanieczyszczenia różnych radioizotopów.
Wszelkie plamy z substancji radioaktywnych muszą być natychmiast oczyszczone zgodnie z procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa radiologicznego. Odpady radioaktywne muszą być usuwane zgodnie z miejscowymi przepisami i ogólnie przyjętymi wytycznymi obowiązującymi w laboratorium. Przestrzeganie podstawowych zasad bezpieczeństwa radiologicznego zapewnia wystarczające zabezpieczenie.
Składniki zawierające ludzką krew, dostarczone w zestawie, zostały przebadane metodami zaaprobowanymi przez instytucje europejskie i/lub FDA. Stwierdzono, że nie zawierają one HbsAg, przeciwciał anti-HCV, anti-HIV-1 i 2. Żadna ze znanych metod nie może dać całkowitej pewności że materiały pochodzenia ludzkiego nie przeniosą czynników zakaźnych wirusowego zapalenia wątroby, AIDS i innych. Dlatego postępowanie z odczynnikami i próbkami surowicy lub osocza powinno być zgodne z miejscowymi procedurami dotyczącymi bezpieczeństwa.
Produkty pochodzenia zwierzęcego były pobierane od zdrowych zwierząt. Składniki bydlęce pochodzą z krajów, w których nie odnotowano występowania BSE. Pomimo to, składniki zawierające substancje pochodzenia zwierzęcego powinny być traktowane jako potencjalnie zakaźne.
Unikać kontaktu skóry z odczynnikami (zawierają azydek sodowy jako środek konserwujący). Azydek znajdujący się w zestawie może reagować z miedzią i ołowiem w układzie kanalizacyjnym tworząc związki o właściwościach wybuchowych. W czasie płukania odprowadzany płyn należy płukać dużymi objętościami wody, aby zapobiec kumulacji azydków.
Nie wolno palić, spożywać napojów ani pokarmów, bądź używać kosmetyków w miejscu pracy. Nie pipetować ustami. Zakładać ubranie ochronne i rękawiczki jednorazowe.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1.

ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2.

GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3.

HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4.

METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5.

PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6.

SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7.

WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. PODSUMOWANIE PROTOKOŁU

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

Nr katalogowy DIAsource KIP0629	Numer P.I. 1700461/pl	Nr aktualizacji : 150324/1
------------------------------------	--------------------------	-------------------------------

Data wydania : 2015-03-24



bu

Прочетете целия протокол преди употреба

E2-RIA-CT

I. УПОТРЕБА

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

II. ОБЩА ИНФОРМАЦИЯ

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

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

III. КЛИНИЧЕН ПРЕГЛЕД

A. Биологична активност

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

B. Клинично приложение

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

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

IV. ПРИНЦИПИ НА МЕТОДА

Определено количество стероид, натоварен с ¹²⁵I, се конкурира със стероида, който трябва да се измери в пробата или в калибратора, за определено количество антитела, които са имобилизирани към стената на полистиреновата епруветка. Не се изискват нито екстракция, нито хроматография поради високата специфичност на покритите антитела. След 3 часа инкубация при температура 37°C конкурентната реакция приключва с аспирация. След това епруветките се измиват с 3 ml разтвор за измиване и се аспирират наново. Прави се калибрационна крива и се определят концентрациите на Е2 чрез интерполация на дозата от калибрационната крива.

V. ИЗПОЛЗВАНИ РЕАГЕНТИ

Реагенти	Количество 96 теста	Цветен код	Приготвяне
Епруветки, покрити с анти-Е2	2 x 48	кафяв	Готов за употреба
Ag ¹²⁵I CONC ПРОСЛЕДЯВАЩО ВЕЩЕСТВО: Е2 натоварен с ¹²⁵I (HPLC) в разтвор на етилов алкохол	1 флакон 1 ml 142 kBq	червен	Пренесете <i>количествено</i> етаноловия разтвор в трейсърния буфер
TRACER BUF Трейсърен буфер с волски желатин и азид (<0,1%)	1 флакон 53 ml	черен	Готов за употреба
CAL 0 Нулев Калибратор в човешки серум и азид (0.5%)	1 флакон 5 ml	жълт	Готов за употреба
CAL N Калибратор - N = 1 до 6 (виж точните стойности на етикета на флаконите) в човешки серум и азид (0.5%)	6 флакона 1 ml	жълт	Готов за употреба
WASH SOLN CONC Измиващ разтвор (TRIS-HCl)	1 флакон 10 ml	кафяв	Разредете 70х с дестилирана вода (използвайте магнитен сепаратор)
CONTROL N Контроли 1 и 2 в човешки серум с тимол	2 флакона лиофилизирани	сребърен	Добавете 0.5 ml дестилирана вода

Забележка: Използвайте нулевия калибратор за серумните разреждания.

VI. СРЕДСТВА, КОИТО НЕ СЕ ОСИГУРЯВАТ

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

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

VII. ПРИГОТВЯНЕ НА РЕАГЕНТА

- A. Трейсър:** Пренесете количествено разтвора на етилов алкохол в трейсърния буфер и разклатете
- B. Контроли:** Реконституируйте контролите с 0.5 ml дестилирана вода.
- B. Работен измиващ разтвор:** Подгответе адекватен обем от работния измиващ разтвор чрез добавянето на 69 обема дестилирана вода към 1 обем от измиващия разтвор (70х). Използвайте магнитен сепаратор, за да хомогенизирате. Изхвърлете неупотребеното количество от работния измиващ разтвор в края на деня.

VIII. СЪХРАНЕНИЕ И СРОК НА ГОДНОСТ НА РЕАГЕНТИТЕ

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

IX. СЪБИРАНЕ НА ПРОБИТЕ И ОБРАБОТКА

- Серумът трябва да се съхраняват при температури 2-8°C.
- Ако тестът не се направи в рамките на 24 часа, се препоръчва съхраняването в аликвоти при -20°C.
- Избягвайте последващи цикли на замразяване-размразяване.

X. ПРОЦЕДУРА

- A. Общи бележки**
- Не използвайте кита или компонентите му след датата на изтичане срока на годност. Не смесвайте материали от различни партии китове. Преди употреба оставете всички реагенти на стайна температура. Внимателно смесвайте всички реагенти с пробите чрез нежно раклащане или въртеливо размесване. За да избегнете кръстосана контаминация, използвайте чист пипетен накрайник за еднократна употреба за добавянето на всеки реагент към съответната проба. Високо прецизираните пипети или автоматичните пипети биха подобрили точността. Съобразявайте се с времето за инкубация. Подгответе калибрационна крива за всяко измерване и не използвайте данни от предишни измервания.

B. Процедура

- Означете две по две покритите епруветки за всеки калибратор, контрола и проба. За определяне на общия брой импулси, обозначете 2 нормални епруветки.
- Разклатете за кратко време калибраторите, контролите и пробите и разпределете по 50 µl от всяко в съответните епруветки.
- Разпределете 500 µl Е2, натоварен с ¹²⁵йод във всяка епруветка, включително в непокритите епруветки за общото преброяване.
- Разклатете нежно с ръка контейнера с епруветките, за да освободите всяко останало въздушно мехурче.
- Инкубирайте за 3 часа при температура 37°C във водна баня.
- Аспирирайте (или прелейте) съдържанието на всяка епруветка (освен епруветките за определяне на общия брой импулси). Уверете се, че пластмасовият край на аспиратора достига дъното на покритата епруветка, за да може да отстрани цялата течност.
- Измийте епруветките с 3 ml Работен Разтвор за измиване (с изключение на общия брой) и аспирирайте (или прелейте). Избягвайте разпенване по време на добавянето на Работния Разтвор за измиване.
- Оставете епруветките в изправено положение за две минути и аспирирайте останалите капки течност.
- Отчетете епруветките в гама брояч за 60 секунди.

XI. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

- Изчислете средното аритметично на резултатите, получени от две по две епруветките.
 - Изчислете свързващата радиоактивност като процент от свързването, определен при нулевата калибрационна точка (0) според следната формула :
- $$\frac{B}{B_0} (\%) = \frac{\text{брой (Калибратор и проба)}}{\text{брой (Нулев Калибратор)}} \times 100$$
- Използвайки 3 циклична семи-логаритмична или logit-log графична хартия, нанесете (B/B0(%)) стойностите за всяка калибрационна точка като функция на Е2 концентрацията на всяка калибрационна точка. Отхвърлете очевидните отклонения..
 - Компютърно асистиран метод също могат да бъдат използвани, за да се построи калибрационната крива. Ако се използва автоматичен метод

- на обработка на резултатите, се препоръчва подходяща 4-параметрова логистична крива.
- Чрез интерполация на (В/В0 (%)) стойностите от пробата се определят Е2 концентрации на пробите от калибрационната крива.
 - Процентът на общото проследяващо вещество, свързано при липса на ненатоварен Е2 (В0/Т), трябва да се провери за всяко изследване.

XII. ХАРАКТЕРНИ ДАННИ

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

Е2-RIA-CT	срп	В/Во (%)
Общ брой	47330	
Калибратор		
0 pg/ml	19724	100,0
18 pg/ml	17947	91,0
35 pg/ml	14990	76,0
152 pg/ml	10995	55,7
433 pg/ml	6012	30,5
1818 pg/ml	2439	12,4
3604 pg/ml	1630	8,3

XIII. ИЗПЪЛНЕНИЕ И ОГРАНИЧЕНИЯ

А. Определен лимит

двадесет и втора нулеви калибратора са били изпитани заедно с комплект от други калибратори. Определения лимит, дефиниран като явната концентрация на две стандартни отклонения над средния брой при нулево свързване, е бил 6,4 pg/ml.

В. Специфичност

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

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

Г. Прецизност

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

SD : Стандартно отклонение; CV: Коефициент на вариация

D. Точност

ТЕСТ С РАЗРЕЖДАНЕ			
Разреждане	Теоретична концентрация (pg/ml)	Измерената концентрация (pg/ml)	Възстановен (%)
1/1	1877,0	1877,0	100
1/2	938,5	801,4	85
1/4	469,3	412,7	88
1/8	234,6	180,8	77
1/16	117,3	96,7	82
1/32	58,7	58,7	100
1/64	29,3	25,5	87
1/128	14,7	15,4	105

Пробите бяха разредени с нулев калибратор

Измерените и теоретични концентрации са в съответствие: Y (измерените) = 0,99X (теоретични) + 27,0, R² = 0,995

ВЪЗСТАНОВИТЕЛЕН ТЕСТ				
Проба	добавен Е2 (pg/ml)	Теоретична Е2 (pg/ml)	Измерената Е2 (pg/ml)	Възстанове н (%)
1	0	NA	13	NA
	10	23	18	78
	50	63	52	83
	200	213	178	84
	500	513	565	110
	1000	1013	947	93
	2000	2013	2052	102
	3000	3013	2912	97
2	0	NA	8	NA
	10	18	23	128
	50	58	58	99
	200	208	201	97
	500	508	509	100
	1000	1008	934	93
	2000	2008	1851	92
	3000	3008	2807	93

Измерените и теоретични концентрации са в съответствие:
Проби 1: Y (измерените) = 0,98X (теоретични) + 0,9, R² = 0,998
Проби 1: Y (измерените) = 0,93X (теоретични) + 10,2, R² = 1,000

Конверсионен фактор:

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

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

D. Закъснение

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

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

XIV. ВЪТРЕШЕН КАЧЕСТВЕН КОНТРОЛ

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

XV. РЕФЕРЕНТНИ ИНТЕРВАЛИ

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

	Интервал на концентрацията (2,5 до 97,5%) (pg/ml)	Средна концентрация (pg/ml)	Брой субекти
Нормални мъже	15 - 47	27	59
Нормални жени			
· Фоликуларна фаза (ден –10 до –3)	50 – 482	137	35
· Преовулаторен период (ден –1 & 0)	66 – 488	176	33
· Лутеална фаза (ден 3 до 10)	51 – 376	119	40
· След менопауза	6 - 53	16	72
Бременност			
· Първи триместър	510 - 6300		20
· Втори триместър	2400 - 18900		26
· Трети триместър	11900 - 37100		20

XVI. ПРЕДПАЗНИ МЕРКИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ

Безопасност

Само за *in vitro* диагностика.
Този набор съдържа ¹²⁵I (полуживот: 60 дни), емитиращ йонизиращи X (28 keV) и γ (35,5 keV) лъчения.
Този радиоактивен продукт може да се пренася и да се използва само от оторизирани лица; покупката, съхранението, употребата и размяната на радиоактивни продукти са предмет на законодателството на държавата, на крайния потребител. Този продукт не бива в никакъв случай да се прилага на хора или животни.
Боравенето с радиоактивния продукт трябва да се извършва в определена за целта територия, далеч от регулярни зони на преминаване. В лабораторията трябва да се поддържа дневник за получаването и съхранението на радиоактивни материали. Лабораторната екипировка и стъклария, които могат да бъдат контаминирани с радиоактивни субстанции, трябва да бъдат отделени с цел да се избегне кръстосана контаминация с различни радиоизотопи.
Всякакви радиоактивни пръски трябва да се почистват незабавно в съответствие с процедурите за радиационна безопасност. Радиоактивните отпадъци трябва да се изхвърлят, следвайки местните наредби и ръководства на властите, упражняващи юрисдикцията, над лабораториите. Придържането към основните правила за радиационна безопасност осигуряват адекватна защита.
Човешките кръвни компоненти, включени в кита, са били тествани чрез одобрени от Европейски и/или FDA (Американска агенция по храните и лекарствата) методи и са дали отрицателен резултат за HbsAg, анти-HCV, анти-HIV-1 и 2. Няма известен метод, който да дава пълна гаранция за това, че човешките кръвни деривати не пренасят хепатит, СПИН или други инфекции. Ето защо, боравенето със реагентите, серумните или плазмените проби трябва да бъде в съответствие с местните процедури по безопасност. Всички животински продукти и деривати са били събирани от здрави животни. Волските компоненти са с произход от страни, където BSE (волска серумна енцефалопатия) не е била установявана. Независимо от това, компонентите, съдържащи животински субстанции трябва да се третират като потенциално инфекциозни.
Избягвайте какъвто и да било кожен контакт с реагентите (съдържат натриев азид като консервант). Азидът в този кит може да реагира с оловото и медта във водопроводните инсталации като по този начин се получават силно експлозивни метални азиди. По време на измивния етап, промийте със силна и обилна струя вода канализацията, за да избегнете формирането на азиди.
Не пушете, не пийте, не яжте и не си слагайте козметика в работната територия. Не пипетирайте с уста. Използвайте защитно облекло и ръкавици за еднократна употреба.

XVII. БИБЛИОГРАФИЯ

1.

ALPER M et al (1987)
Comparison of follicular fluid hormones in patients with one or two ovaries participating in a program of in vitro fertilization.
Fertil.and Steril., 48, 1, 94-97.

2.

GERRIS J. et al. (1986)
A lesion from IVF endocrinology: the importance of the follicular phase to success and failure in non IVF cycle.
Acta. Eur. Fertil. 17, 4, 251-258

3.

HENNY A.B. et al (1986)
Diagnosis of luteinized unruptured follicle by ultrasound and steroid hormone assays in peritoneal fluid: a comparative study.
Fertil. and Steril. 46, 5, 823-827

4.

METHA R.R. (1987)
Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17-β-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH) Activity in malignant and non malignant human breast tissues.
Int. J. Cancer 40, 305-308

5.

PELLICER A. et al (1987)
Outcome of in vitro fertilization in women with low response to ovarian stimulation.
Fertil. and Steril. 47, 5, 812-815.

6.

SELBY et al (1986)
Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women.
Br.Med. 293, 1337-1339.

7.

WRONSLY H. et al (1987)
Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro fertilization in stimulated cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index.
Hum. Reprod. 4, 325-328.

XVIII. ОБОБЩЕНИЕ НА ПРОТОКОЛА

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

DIAsource каталог номер: KIP0629	P.I. номер: 1700461/bu	Номер на ревизия: 150324/1
-------------------------------------	---------------------------	-------------------------------

Дата на ревизия: 2015-03-24

	Used symbols
	Consult instructions for use
	Storage temperature
	Use by
LOT	Batch code
REF	Catalogue number
CONTROL	Control
IVD	In vitro diagnostic medical device
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
WASH SOLN CONC	Wash solution concentrated
CAL 0	Zero calibrator
CAL N	Calibrator #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer concentrated
Ab 125I CONC	Tracer concentrated
	Tubes
INC BUF	Incubation buffer
ACETONITRILE	Acetonitrile
SERUM	Serum
DIL SPE	Specimen diluent
DIL BUF	Dilution buffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunoadsorbent
DIL CAL	Calibrator diluent
REC SOLN	Reconstitution solution
PEG	Polyethylene glycol
EXTR SOLN	Extraction solution
ELU SOLN	Elution solution
GEL	Bond Elut Silica cartridges
PRE SOLN	Pre-treatment solution
NEUTR SOLN	Neutralization solution
TRACEUR BUF	Tracer buffer
µT	Microtiterplate
Ab HRP	HRP Conjugate
Ag HRP	HRP Conjugate
Ab HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
Ag HRP CONC	HRP Conjugate concentrate
CONJ BUF	Conjugate buffer
CHROM TMB CONC	Chromogenic TMB concentrate
CHROM TMB	Chromogenic TMB solution
SUB BUF	Substrate buffer
STOP SOLN	Stop solution
INC SER	Incubation serum
BUF	Buffer
Ab AP	AP Conjugate
SUB PNPP	Substrate PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin conjugate concentrate
PREC AGENT	Precipitating Agent
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentrate
ASS BUF	Assay buffer
Ab BIOT	Biotin conjugate
Ab	Specific Antibody
SAV HRP CONC	Streptavidin HRP concentrate
NSB	Non-specific binding
2nd Ab	2nd Antibody
ACID BUF	Acidification Buffer
DIST	Distributor
TRAY	Incubation trays
PMSF	PMSF solution
	Protect from light
STRIP	Dot Strip
SUB	Substrate
EXTR SOLN CONC	Extraction Buffer Concentrate
CART	Cartridge
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Wash buffer

	Symboles utilisés
	Consulter les instructions d'utilisation
	Température de conservation
	Utiliser jusqu'à
LOT	Numéro de lot
REF	Référence de catalogue
CONTROL	Contrôle
I V D	Dispositif médical de diagnostic in vitro
	Fabricant
	Contenu suffisant pour <n> tests
WASH SOLN CONC	Solution de lavage concentrée
CAL 0	Calibrateur zéro
CAL N	Calibrateur #
CONTROL N	Contrôle #
Ag 125I	Traceur
Ab 125I	Traceur
Ag 125I CONC	Traceur concentré
Ab 125I CONC	Traceur concentré
	Tubes
INC BUF	Tampon d'incubation
ACETONITRILE	Acétonitrile
SERUM	Sérum
DIL SPE	Diluant du spécimen
DIL BUF	Tampon de dilution
ANTISERUM	Antisérum
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbant
DIL CAL	Diluant de calibrateur
REC SOLN	Solution de reconstitution
PEG	Glycol Polyéthylène
EXTR SOLN	Solution d'extraction
ELU SOLN	Solution d'élution
GEL	Cartouches Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solution de pré-traitement
NEUTR SOLN	Solution de neutralisation
TRACEUR BUF	Tampon traceur
	Microplaque de titration
Ab HRP	HRP Conjugué
Ag HRP	HRP Conjugué
Ab HRP CONC	HRP Conjugué concentré
Ag HRP CONC	HRP Conjugué concentré
CONJ BUF	Tampon conjugué
CHROM TMB CONC	Chromogène TMB concentré
CHROM TMB	Solution chromogène TMB
SUB BUF	Tampon substrat
STOP SOLN	Solution d'arrêt
INC SER	Sérum d'incubation
BUF	Tampon
Ab AP	AP Conjugué
SUB PNPP	Tampon PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotine conjugué concentré
PREC AGENT	Agent de précipitation
AVID HRP CONC	Avidine HRP concentré
ASS BUF	Tampon de test
Ab BIOT	Biotine conjugué
Ab	Anticorps spécifique
SAV HRP CONC	Concentré streptavidine HRP
NSB	Liant non spécifique
2nd Ab	Second anticorps
ACID BUF	Tampon d'acidification
DIST	Distributeur
TRAY	Plaque d'incubation
PMSF	Solution PMSF
	Conserver à l'abri de la lumière
STRIP	Bandelette de dots
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Tampon d'extraction concentré
CART	Cartouche
SAV HRP	Streptavidine-peroxydase de renfort
PIPETTE	Pipette
WASH SOLN	Tampon de lavage

	<u>Benutzte Symbole</u>
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lagern bei
	Verwendbar bis
LOT	Chargenbezeichnung
REF	Bestellnummer
CONTROL	Kontrolle
I V D	In Vitro Diagnostikum
	Hersteller
	Ausreichend für <n> Ansätze
WASH SOLN CONC	Waschlösung-Konzentrat
CAL 0	Null kalibrator
CAL N	Kalibrator #
CONTROL N	Kontrolle #
Ag 125I	Tracer
Ab 125I	Tracer
Ag 125I CONC	Tracer Konzentrat
Ab 125I CONC	Tracer Konzentrat
	Röhrchen
INC BUF	Inkubationspuffer
ACETONITRILE	Azetonitril
SERUM	Humanserum
DIL SPE	Probenverdünner
DIL BUF	Verdünnungspuffer
ANTISERUM	Antiserum
IMMUNOADSORBENT	Immunadsorbens
DIL CAL	Kalibratorverdünnung
REC SOLN	Rekonstitutionslösung
PEG	Polyethylenglykol
EXTR SOLN	Extraktionslösung
ELU SOLN	Eluierungslösung
GEL	Bond Elut Silikakartuschen
PRE SOLN	Vorbehandlungslösung
NEUTR SOLN	Neutralisierungslösung
TRACEUR BUF	Tracer-Puffer
	Mikrotiterplatte
Ab HRP	HRP Konjugat
Ag HRP	HRP Konjugat
Ab HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
Ag HRP CONC	HRP Konjugat Konzentrat
CONJ BUF	Konjugatpuffer
CHROM TMB CONC	Chromogenes TMB Konzentrat
CHROM TMB	Farblösung TMB
SUB BUF	Substratpuffer
STOP SOLN	Stopplösung
INC SER	Inkubationsserum
BUF	Puffer
Ab AP	AP Konjugat
SUB PNPP	Substrat PNPP
BIOT CONJ CONC	Biotin-Konjugat-Konzentrat
PREC AGENT	Fällungsreagenz
AVID HRP CONC	Avidin-HRP-Konzentrat
ASS BUF	Assaypuffer
Ab BIOT	Biotin-Konjugat
Ab	Spezifischer Antikörper
SAV HRP CONC	HRP Streptavidinkonzentrat
NSB	Unspezifische Bindung
2nd Ab	Sekundärer Antikörper
ACID BUF	Ansäuerungspuffer
DIST	Vertreiber
TRAY	Inkubationsschale
PMSF	PMSF Lösung
	Vor Licht schützen
STRIP	Tüpfelstreifen
SUB	Substrat
EXTR SOLN CONC	Konzentrat Extraktionspuffer
CART	Kassette
SAV HRP	Streptavidin HRP
PIPETTE	Pipet
WASH SOLN	Waschpuffer

		Simboli utilizzati			
		Consultare le istruzioni per l'uso			
		Limitazioni di temperatura			
		Utilizzare entro			
LOT		Numero di lotto			
REF		Numero di catalogo			
CONTROL		Controllo			
I V D		Dispositivo medico-diagnostico in vitro			
		Fabbricante			
		Contenuto sufficiente per <n> saggi			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC		Tampone di lavaggio concentrato
WASH	SOLN	CONC			
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0		Calibratore zero	
CAL	0				
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N		Standard #	
CAL	N				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N		Controllo #	
CONTROL	N				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td></tr></table>	Ag	125I		Marcato	
Ag	125I				
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td></tr></table>	Ab	125I		Marcato	
Ab	125I				
<table><tr><td>Ag</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	125I	CONC		Marcato concentrato
Ag	125I	CONC			
<table><tr><td>Ab</td><td>125I</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	125I	CONC		Marcato concentrato
Ab	125I	CONC			
		Provette			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF		Tampone incubazione	
INC	BUF				
ACETONITRILE		Acetonitrile			
SERUM		Siero			
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE		Diluyente campione	
DIL	SPE				
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF		Tampone diluizione	
DIL	BUF				
ANTISERUM		Antisiero			
IMMUNOADSORBENT		Immunoassorbente			
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL		Diluyente calibratore	
DIL	CAL				
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN		Soluzione di ricostituzione	
REC	SOLN				
PEG		Polietilenglicole			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN		Soluzione di estrazione	
EXTR	SOLN				
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN		Soluzione di eluizione	
ELU	SOLN				
GEL		Cartucce di silice bond elut			
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN		Soluzione di pretrattamento	
PRE	SOLN				
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN		Soluzione di neutralizzazione	
NEUTR	SOLN				
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF		Tracer Buffer	
TRACEUR	BUF				
		Piastra di microtitolazione			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP		HRP Coniugato	
Ab	HRP				
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP		HRP Coniugato	
Ag	HRP				
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ab	HRP	CONC			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC		HRP Coniugato concentrato
Ag	HRP	CONC			
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF		Buffer coniugato	
CONJ	BUF				
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC		Cromogena TMB concentrato
CHROM	TMB	CONC			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB		Soluzione cromogena TMB	
CHROM	TMB				
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF		Tampone substrato	
SUB	BUF				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN		Soluzione di arresto	
STOP	SOLN				
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER		Incubazione con siero	
INC	SER				
BUF		Buffer			
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP		AP Coniugato	
Ab	AP				
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP		Substrato PNPP	
SUB	PNPP				
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC		Concentrato coniugato con biotina
BIOT	CONJ	CONC			
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT		Agente precipitante	
PREC	AGENT				
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC		Concentrato avidina HRP
AVID	HRP	CONC			
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF		Soluzione tampone per test	
ASS	BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT		Coniugato con biotina	
Ab	BIOT				
Ab		Anticorpo Specifico			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC		Streptavidina-HRP concentrata
SAV	HRP	CONC			
NSB		Legame non-specifico			
2nd Ab		2° Anticorpo			
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF		Tampone Acidificante	
ACID	BUF				
DIST		Distributore			
TRAY		Vassoi di incubazione			
PMSF		Soluzione di PMSF			
		Proteggere dalla luce			
STRIP		Dot strip			
SUB		Substrato			
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC		Concentrato del tampone di estrazione
EXTR	SOLN	CONC			
CART		Cartuccia			
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP		HRP coniugata a streptavidina	
SAV	HRP				
PIPETTE		Pipetta			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN		Tampone di lavaggio	
WASH	SOLN				

	<u>Símbolos utilizados</u>
	Consultar las instrucciones de uso
	Limitación de temperatura
	Fecha de caducidad
LOT	Código de lote
REF	Número de catálogo
CONTROL	Control
I V D	Producto sanitario para diagnóstico in vitro
	Fabricante
	Contenido suficiente para <n> ensayos
WASH SOLN CONC	Solución de lavado concentrada
CAL 0	Calibrador cero
CAL N	Calibrador #
CONTROL N	Control #
Ag 125I	Trazador
Ab 125I	Trazador
Ag 125I CONC	Trazador concentrada
Ab 125I CONC	Trazador concentrada
	Tubos
INC BUF	Tampón de incubación
ACETONITRILE	Acetonitrilo
SERUM	Suero
DIL SPE	Diluyente de Muestra
DIL BUF	Tampón de dilución
ANTISERUM	Antisuero
IMMUNOADSORBENT	Inmunoadsorbente
DIL CAL	Diluyente de calibrador
REC SOLN	Solución de Reconstitución
PEG	Glicol Polietileno
EXTR SOLN	Solución de extracción
ELU SOLN	Solución de elución
GEL	Cartuchos Bond Elut Silica
PRE SOLN	Solución de Pre-tratamiento
NEUTR SOLN	Solución de Neutralización
TRACEUR BUF	Tampón de trazador
	Placa de microvaloración
Ab HRP	HRP Conjugado
Ag HRP	HRP Conjugado
Ab HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
Ag HRP CONC	HRP Conjugado concentrada
CONJ BUF	Tampón de Conjugado
CHROM TMB CONC	Cromógeno TMB concentrada
CHROM TMB	Solución Cromógeno TMB
SUB BUF	Tampón de sustrato
STOP SOLN	Solución de Parada
INC SER	Suero de Incubación
BUF	Tampón
Ab AP	AP Conjugado
SUB PNPP	Sustrato PNPP
BIOT CONJ CONC	Concentrado de conjugado de biotina
PREC AGENT	Agente de precipitación
AVID HRP CONC	Concentrado avidina-HRP
ASS BUF	Tampón de ensayo
Ab BIOT	Conjugado de biotina
Ab	Anticuerpo específico
SAV HRP CONC	Estreptavidina-HRP Concentrado
NSB	Unión no específica
2nd Ab	Segundo anticuerpo
ACID BUF	Tampón de Acidificación
DIST	Distribuidor
TRAY	Bandejas de incubación
PMSF	Solución de PMSF
	Proteger de la luz
STRIP	Test Dot
SUB	Sustrato
EXTR SOLN CONC	Concentrado de tampón de extracción
CART	Cartucho
SAV HRP	Estreptavidina HRP
PIPETTE	Pipeta
WASH SOLN	Tampón de lavado

	<u>Χρησιμοποιούμενα σύμβολα</u>
	Συμβουλευτείτε τις οδηγίες χρήσης
	Θερμοκρασία αποθήκευσης
	Ημερομηνία λήξης
LOT	Αριθμός παρτίδας
REF	Αριθμός καταλόγου
CONTROL	Πρότυπο ελέγχου
IVD	In Vitro Διαγνωστικό Ιατροτεχνολογικό προϊόν
	Κατασκευαστής
	Περιεχόμενο επαρκές για «ν» εξετάσεις
WASH SOLN CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα έκπλυσης
CAL 0	Μηδενικός βαθμονομητής
CAL N	Βαθμονομητής #
CONTROL N	Ορός ελέγχου #
Ag 12SI	Ιχνηθέτης
Ab 12SI	Ιχνηθέτης
Ag 12SI CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
Ab 12SI CONC	Χρωμογόνος Ιχνηθέτης
	Σωληνάρια
INC BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης
ACETONITRILE	Ακετονιτρίλιο
SERUM	Ορός
DIL SPE	Διάλυμα αραιώσης δειγμάτων
DIL BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα αραιώσης
ANTISERUM	Αντιορός
IMMUNOADSORBENT	Ανοσοπροσροφητικό
DIL CAL	Αραιωτικό βαθμονομητών
REC SOLN	Διάλυμα ανασύστασης
PEG	Πολυαιθυλενογλυκόλη
EXTR SOLN	Διάλυμα εκχύλισης
ELU SOLN	Διάλυμα έκλουσης
GEL	Φύσιγγες πυριτίου Bond Elut
PRE SOLN	Διάλυμα προεπεξεργασίας
NEUTR SOLN	Διάλυμα εξουδετέρωσης
TRACEUR BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
	Πλάκα μικροτιτλοδότησης
Ab HRP	HRP Σύζευγμα
Ag HRP	HRP Σύζευγμα
Ab HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
Ag HRP CONC	Χρωμογόνος HRP Σύζευγμα
CONJ BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα συζεύγματος
CHROM TMB CONC	Χρωμογόνος TMB
CHROM TMB	Διάλυμα χρωμογόνου TMB
SUB BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος
STOP SOLN	Ανασχετικό αντιδραστήριο
INC SER	Ορός επώασης
BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα
Ab AP	AP Σύζευγμα
SUB PNPP	PNPP υποστρώματος
BIOT CONJ CONC	Συμπυκνωμένο αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
PREC AGENT	Παράγοντας καθίζησης
AVID HRP CONC	Συμπυκνωμένο διάλυμα αβιδίνης-HRP
ASS BUF	Ρυθμιστικό διάλυμα προσδιορισμού
Ab BIOT	αντιδραστήριο συζευγμένο με βιοτίνη
Ab	Ειδικό Αντίσωμα
SAV HRP CONC	Συμπυκνωμένη στρεπταβιδίνη συνεζευγμένη με HRP
NSB	μη-ειδική δέσμευση
2nd Ab	2ο Αντίσωμα
ACID BUF	Ρυθμιστικό Διάλυμα οξίνου
DIST	Διανομέας
TRAY	Δίσκοι επώασης
PMSF	Διάλυμα PMSF
	Προστατεύετε από το φως
STRIP	Ταινία κουκκίδων
SUB	Υπόστρωμα
EXTR SOLN CONC	Συμπύκνωμα ρυθμ. διαλύματος εκχύλισης
CART	Φύσιγγα
SAV HRP	Στρεπταβιδίνη HRP
PIPETTE	πιπέτα
WASH SOLN	Ρυθμιστικό διάλυμα πλύσης

	<u>Używane symbole</u>		
	Przed zastosowaniem zapoznać się z instrukcją		
	Temperatura przechowywania		
	Zużyć przed		
LOT	Kod serii		
REF	Numer katalogowy		
CONTROL	Kontrola		
IV D	Urządzenie medyczne do diagnostyki in vitro		
	Producent		
	Zawartość wystarczająca do <n> testów		
WASH	SOLN	CONC	Roztwór płuczący stężony
CAL	0		Kalibrator zerowy
CAL	N		Kalibrator nr
CONTROL	N		Kontrola nr
Ag	12SI		Znacznik izotopowy
Ab	12SI		Znacznik izotopowy
Ag	12SI	CONC	Znacznik izotopowy stężony
Ab	12SI	CONC	Znacznik izotopowy stężony
	Probówki		
INC	BUF		Wymagana inkubacja buforu
ACETONITRILE	Acetonitryl		
SERUM	Surowica		
DIL	SPE		Rozcieńczalnik próbki
DIL	BUF		Bufor do rozcieńczania
ANTISERUM	Antysurowica		
IMMUNOADSORBENT	Immunoabsorbent		
DIL	CAL		Rozcieńczalnik kalibratora
REC	SOLN		Roztwór do rozcieńczania
PEG	Glikol poli(oksy)etylenowy		
EXTR	SOLN		Roztwór ekstrakcyjny
ELU	SOLN		Roztwór elucyjny
GEL	Kolumny krzemionkowe Bond Elut		
PRE	SOLN		Roztwór do przygotowania wstępnego
NEUTR	SOLN		Roztwór neutralizujący
TRACELUR	BUF		Bufor znacznika
	mikropłytki		
Ab	HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ag	HRP		Koniugat peroksydazy chrzanowej
Ab	HRP	CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
Ag	HRP	CONC	Koncentrat koniugatu peroksydazy chrzanowej
CONJ	BUF		Bufor do koniugacji
CHROM	TMB	CONC	Koncentrat chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
CHROM	TMB		Roztwór chromogenu TMB (czterometylobenzydyny)
SUB	BUF		Bufor substratu
STOP	SOLN		Roztwór zatrzymujący reakcję
INC	SER		Wymagana inkubacja surowicy
BUF	Bufor		
Ab	AP		Koniugat AP (fosfatazy alkalicznej)
SUB	PNPP		p-nitrofenylofosforan substratowy
BIOT	CONJ	CONC	Koncentrat koniugatu biotyny
PREC	AGENT		Środek strącający
AVID	HRP	CONC	Koncentrat peroksydazy chrzanowej z awidyną
ASS	BUF		Bufor do oznaczania
Ab	BIOT		Koniugatu biotyny
Ab	Przeciwciało swoiste		
SAV	HRP	CONC	Koncentrat streptawidyny HRP
NSB	Wiązanie nieswoiste		
2nd Ab	Drugie przeciwciało		
ACID	BUF		Bufor zakwaszający
DIST	Dystrybutor		
TRAY	Tacki do inkubacji		
PMSF	Roztwór fluorku fenylometylosulfonylu (PMSF - z ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)		
	Chronić przed światłem		
STRIP	Pasek testowy z antygenami - „Dot Strip”		
SUB	Substrat		
EXTR	SOLN	CONC	Stężony bufor do ekstrakcji
CART	Kaseta		
SAV	HRP		Streptawidyna sprzężona z peroksydazą chrzanową (HRP - z ang. horseradish peroxidase)
PIPETTE	Pipeta		
WASH	SOLN		Bufor do płukania

		Използвани символи			
		Вижте инструкцията за работа			
		Температура на съхранение			
		Използвайте с			
LOT		Партиден код			
REF		Каталожен номер			
CONTROL		Контрол			
IVD		Ин витро диагностично медицинско изделие			
		Производител			
		Съдържание достатъчно за <n> теста			
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	WASH	SOLN	CONC		Концентриран измиващ разтвор
WASH	SOLN	CONC			
<table><tr><td>CAL</td><td>0</td></tr></table>	CAL	0		Нулев калибратор	
CAL	0				
<table><tr><td>CAL</td><td>N</td></tr></table>	CAL	N		Калибратор #	
CAL	N				
<table><tr><td>CONTROL</td><td>N</td></tr></table>	CONTROL	N		Контрол #	
CONTROL	N				
<table><tr><td>Ag</td><td>12SI</td></tr></table>	Ag	12SI		Трейсьър	
Ag	12SI				
<table><tr><td>Ab</td><td>12SI</td></tr></table>	Ab	12SI		Трейсьър	
Ab	12SI				
<table><tr><td>Ag</td><td>12SI</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	12SI	CONC		Концентриран маркер
Ag	12SI	CONC			
<table><tr><td>Ab</td><td>12SI</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	12SI	CONC		Концентриран маркер
Ab	12SI	CONC			
		Епруветки			
<table><tr><td>INC</td><td>BUF</td></tr></table>	INC	BUF		Инкубационен буфер	
INC	BUF				
<table><tr><td>ACETONITRILE</td></tr></table>	ACETONITRILE		Ацетонитрил		
ACETONITRILE					
<table><tr><td>SERUM</td></tr></table>	SERUM		Серум		
SERUM					
<table><tr><td>DIL</td><td>SPE</td></tr></table>	DIL	SPE		Разредител за пробите	
DIL	SPE				
<table><tr><td>DIL</td><td>BUF</td></tr></table>	DIL	BUF		Буфер за разреждане	
DIL	BUF				
<table><tr><td>ANTISERUM</td></tr></table>	ANTISERUM		Антисерум		
ANTISERUM					
<table><tr><td>IMMUNOABSORBENT</td></tr></table>	IMMUNOABSORBENT		Имуноабсорбент		
IMMUNOABSORBENT					
<table><tr><td>DIL</td><td>CAL</td></tr></table>	DIL	CAL		Разредител за калибратора	
DIL	CAL				
<table><tr><td>REC</td><td>SOLN</td></tr></table>	REC	SOLN		Пресъздаващ разтвор	
REC	SOLN				
<table><tr><td>PEG</td></tr></table>	PEG		Полиетилен гликол		
PEG					
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	EXTR	SOLN		Екстрактов разтвор	
EXTR	SOLN				
<table><tr><td>ELU</td><td>SOLN</td></tr></table>	ELU	SOLN		Разтвор за елюиране	
ELU	SOLN				
<table><tr><td>GEL</td></tr></table>	GEL		Силикагелни пълнители		
GEL					
<table><tr><td>PRE</td><td>SOLN</td></tr></table>	PRE	SOLN		Пред-лечебен разтвор	
PRE	SOLN				
<table><tr><td>NEUTR</td><td>SOLN</td></tr></table>	NEUTR	SOLN		Неутрализиращ ратвор	
NEUTR	SOLN				
<table><tr><td>TRACEUR</td><td>BUF</td></tr></table>	TRACEUR	BUF		Маркерен буфер	
TRACEUR	BUF				
		Микротитърна пластина			
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td></tr></table>	Ab	HRP		HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза	
Ab	HRP				
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td></tr></table>	Ag	HRP		HRP конюгат / Конюгат на хрянова пероксидаза	
Ag	HRP				
<table><tr><td>Ab</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ab	HRP	CONC		HRP конюгиран концентрат
Ab	HRP	CONC			
<table><tr><td>Ag</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	Ag	HRP	CONC		HRP конюгиран концентрат
Ag	HRP	CONC			
<table><tr><td>CONJ</td><td>BUF</td></tr></table>	CONJ	BUF		Буфер за конюгата	
CONJ	BUF				
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td><td>CONC</td></tr></table>	CHROM	TMB	CONC		Хромогенен TMB концентрат
CHROM	TMB	CONC			
<table><tr><td>CHROM</td><td>TMB</td></tr></table>	CHROM	TMB		Хромогенен TMB разтвор	
CHROM	TMB				
<table><tr><td>SUB</td><td>BUF</td></tr></table>	SUB	BUF		Субстратен буфер	
SUB	BUF				
<table><tr><td>STOP</td><td>SOLN</td></tr></table>	STOP	SOLN		Стоп разтвор	
STOP	SOLN				
<table><tr><td>INC</td><td>SER</td></tr></table>	INC	SER		Инкубационен серум	
INC	SER				
<table><tr><td>BUF</td></tr></table>	BUF		Буфер		
BUF					
<table><tr><td>Ab</td><td>AP</td></tr></table>	Ab	AP		AP конюгат / конюгат на алкална фосфатаза	
Ab	AP				
<table><tr><td>SUB</td><td>PNPP</td></tr></table>	SUB	PNPP		Субстрат PNPP / пара нитрофенил фосфат	
SUB	PNPP				
<table><tr><td>BIOT</td><td>CONJ</td><td>CONC</td></tr></table>	BIOT	CONJ	CONC		Биотин конюгиран концентрат
BIOT	CONJ	CONC			
<table><tr><td>PREC</td><td>AGENT</td></tr></table>	PREC	AGENT		Преципитиращо вещество	
PREC	AGENT				
<table><tr><td>AVID</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	AVID	HRP	CONC		Авидин HRP концентрат
AVID	HRP	CONC			
<table><tr><td>ASS</td><td>BUF</td></tr></table>	ASS	BUF		Буфер за пробите	
ASS	BUF				
<table><tr><td>Ab</td><td>BIOT</td></tr></table>	Ab	BIOT		Биотин конюгат	
Ab	BIOT				
<table><tr><td>Ab</td></tr></table>	Ab		специфично анти тяло		
Ab					
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td><td>CONC</td></tr></table>	SAV	HRP	CONC		стрептавидин HRP концентрат
SAV	HRP	CONC			
<table><tr><td>NSB</td></tr></table>	NSB		не специфично свързване		
NSB					
<table><tr><td>2nd Ab</td></tr></table>	2nd Ab		второ анти тяло		
2nd Ab					
<table><tr><td>ACID</td><td>BUF</td></tr></table>	ACID	BUF		киселинизиращ буфер	
ACID	BUF				
<table><tr><td>DIST</td></tr></table>	DIST		Дистрибутор		
DIST					
<table><tr><td>TRAY</td></tr></table>	TRAY		Панички за инкубация		
TRAY					
<table><tr><td>PMSF</td></tr></table>	PMSF		Разтвор на ФМСФ		
PMSF					
		Да се пази от светлина			
<table><tr><td>STRIP</td></tr></table>	STRIP		Тест лента с маркерни точки		
STRIP					
<table><tr><td>SUB</td></tr></table>	SUB		Субстрат		
SUB					
<table><tr><td>EXTR</td><td>SOLN</td><td>CONC</td></tr></table>	EXTR	SOLN	CONC		Концентриран екстрактов разтвор
EXTR	SOLN	CONC			
<table><tr><td>CART</td></tr></table>	CART		Касета		
CART					
<table><tr><td>SAV</td><td>HRP</td></tr></table>	SAV	HRP		Стрепдавидин HRP	
SAV	HRP				
<table><tr><td>PIPETTE</td></tr></table>	PIPETTE		Пипети		
PIPETTE					
<table><tr><td>WASH</td><td>SOLN</td></tr></table>	WASH	SOLN		Измиващ разтвор	
WASH	SOLN				