

PATHOZYME® OESTRADIOL ^{Ref} OD477

Test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea cantitativă a Estradiolului în serul sau plasma umane.

Depozitați la 2°C - 8°C . NU CONGELAȚI.

Doar pentru diagnostic in-vitro.

INTRODUCERE

Estradiol (E2) este un hormon steroidian C18 uman, cu un inel fenolic A. Acest hormon steroidian are o greutate moleculară de 272,4 daltoni. Este cel mai puternic estrogen natural, fiind produs în principal de ovare, placenta și într-o măsură mai mică de cortexul suprarenalian și de testicule^{1,2,3}.

Estradiolul este secretat în fluxul sanguin, unde 98% circulă legat de globulina de legare a hormonului sexual (GLHS). Într-o măsură mai mică este legat de alte proteine serice precum albumina. Doar o mică fracție circulează ca hormon liber sau în formă conjugată^{4,5}. Activitatea estrogenică este afectată prin complexele estradiol-receptor care declanșează răspunsul potrivit la nivel nuclear în zonele țintă. Acestea includ foliculii, uterul, sîni, vagina, uretra, hipotalamusul, hipofiza și într-o măsură mai mică ficatul și tegumentul.

La femeile care nu sunt gravide și cu ciclul menstrual normal, secreția de Estradiol urmează un tipar ciclic, bifazic, cu cea mai mare concentrație chiar înainte de ovulație^{6,7}. Concentrația în creștere a estradiolului exercită un feedback pozitiv asupra gonadotropinelor, hormonul stimulant al foliculilor ovarieni (FSH) și hormonul luteinizant (LH) care sunt esențiali pentru maturarea foliculilor și respectiv pentru ovulație^{8,9}. După ovulație, nivelul de Estradiol scade rapid pînă cînd celulele luteale devin active ceea ce determină o ușoară creștere și un nivel în platou al estradiolului în faza luteală. În timpul sarcinii, nivelul de estradiol din serul matern crește considerabil, mult mai mult decît nivelurile maxime pre-ovulatorii, niveluri mari care sunt menținute tot timpul sarcinii¹⁰.

Măsurarea Estradiolului seric este un index valoros în evaluarea unei variații de disfuncții menstruale precum pubertatea precoce sau întârziată la fete¹¹ și amenoreea și menopauza primare și secundare¹². Niveluri mari de Estradiol s-au raportat la pacienții cu sindroame feminizante¹³, ginecomastie¹⁴ și tumori testiculare¹⁵. În cazul infertilității, măsurarea nivelului seric al Estradiolului este folositor pentru monitorizarea inducției ovulației secundare tratamentul cu citrat de clomifen, hormon de eliberare a LH (LH-RH) sau gonadotropinelor exogene^{7,16}. În timpul hiperstimulării ovariene pentru fertilizare in vitro (IVF), concentrațiile serice de Estradiol sunt de obicei monitorizate zilnic pentru administrarea la momentul optim a gonadotropinei corionice umane și pentru recoltarea oocitelor¹⁷.

UTILIZARE

PATHOZYME OESTRADIOL (E2) este un test ImunoEnzimatic (EIA) pentru determinarea Estradiolului (E2) total în serul sau plasma umane.
A fi folosit doar de personalul medical.

PRINCIPIUL TESTULUI

PATHOZYME OESTRADIOL (E2) se bazează pe principiul legării competitive dintre (E2) din proba de testat și Conjugatul (E2)-HRP pentru o cantitate constantă de anticorpi anti-Estradiol de iepure. Anticorpii de capră anti-ierure de tip IgG fixați de godeurile plăcii de microtitrare sunt incubati cu Standarde, Controlle, probe de la pacienți, Conjugat Estradiol-HRP și reactiv anti-Estradiol de iepure. În timpul incubării o cantitate mică de (E2) marcat cu HRP intră în competiție cu (E2) endogen din standard, probă sau ser de control de calitate pentru un număr fix de site-uri de legare de pe anticorpii specifici (E2). În acest fel, cantitatea de conjugat (E2) peroxidază legat imunologic de peretele godeului scade progresiv pe măsură ce crește concentrația de (E2) din probă. Conjugatul (E2) peroxidază nelegat este apoi îndepărtat iar godeurile sunt spălate. Se adaugă apoi o soluție de TMB, ceea ce va duce la apariția unei culori albastre. Dezvoltarea culorii este oprită prin adăugarea soluției de stopare iar absorbanta este măsurată spectrofotometric la 450nm. Intensitatea culorii formate este proporțională cu cantitatea de enzimă prezentă și invers proporțional cu cantitatea de (E2) nemarcat din probă. Se obține o curbă standard raportînd concentrația standardului cu absorbanta. Concentrația (E2) a probelor și controalelor rulate în paralel cu standardele poate fi calculată din curba standard.

Testul a fost calibrat cu standarde interne. Nu există nici un Standard Internațional pentru acest test.

^{Ref}
OD477

CONTENTS

12 x 8 godeuri x 1

Microtitre Plate

Godeuri detașabile "invelite" cu anticorpi specifici, ambalate într-o pungă de folie împănă cu un desicant.

Cal A 0 pg/ml

Standard Referință: Ser uman fără Estradiol.
Gata de lucru. (Incolor)

Cal B 10 pg/ml

Standard Referință: Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru. (Incolor)

Cal C 30 pg/ml

Standard Referință: Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru. (Incolor)

Cal D 100 pg/ml

Standard Referință: Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru. (Incolor)

Cal E 300 pg/ml

Standard Referință: Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru. (Incolor)

Cal F 1000 pg/ml

Standard Referință: Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru. (Incolor)

Control 1 Nivel menționat pe flacon

Nivel cunoscut de Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru (Incolor)

Control	2	Nivel menționat pe flacon	0.5 ml
---------	---	---------------------------	--------

Nivel cunoscut de Estradiol diluat în ser uman.
Gata de lucru (Incolor)

Ab	REAG	Oestradiol	7 ml
----	------	------------	------

Reactiv anticorpi iepure anti Estradiol.
Gata de lucru (Roz)

Conj			11 ml
------	--	--	-------

Estradiol conjugat peroxidază hrean.
Gata de lucru. (Albastru)

Subs	TMB		11 ml
------	-----	--	-------

Soluție Substrat: 3,3', 5,5' Tetrametil Benzidină tampon citrat. Gata de lucru. (Incolor)

Solin	Stop	HCl	1M	11ml
-------	------	-----	----	------

Soluție Stopare: Acid clorhidric diluat în apă purificată. Gata de lucru. (Incolor)

Broșură instrucțiuni și Fișa de înregistrare date EIA 1 + 1

MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT PREZENTE ÎN KIT

Micropipete: 100μl, 200μl și 1000μl
Vîrfuri de pipetă de unică folosință
Hîrtie absorbantă
Cititor microplăci cu filtru de 450nm.
Hîrtie pentru grafic (milimetrică)
Sticlărie de laborator foarte curată.

PRECAUȚIUNI

PATHOZYME OESTRADIOL conține materiale de origine umană care au fost testate și confirmate negative prin proceduri aprobate de FDA pentru anticorpi HCV, HIV I și II și pentru HbsAg, la nivel de donor unic. Deoarece nici un test nu poate oferi o garanție completă că produsele derivate din surse umane nu vor transmite agenți infecțioși, se recomandă ca reactivii din acest kit să fie manipulați cu grijă și atenția corespunzătoare atît în timpul utilizării cit și sunt deșeuiri. Nu ingerați.

Reactivii **PATHOZYME OESTRADIOL** nu conțin substanțe periculoase așa cum sunt definite de legislația Chimică a Marii Britanii (Informații și Ambalare substanțe periculoase pentru Furnizare). Toți reactivii trebuie totuși tratați ca substanțe cu potențial risc biologic atît cînd sunt folosite cit și cînd sunt deșeuiri. Rezolvarea finală a deșeurilor trebuie făcută în conformitate cu legislația locală.

Soluția de Stopare **PATHOZYME OESTRADIOL** este acid clorhidric diluat și este deci corozivă. Manipulați cu grijă. În caz de contact cu tegumentul spălați cu grijă cu apă.

Reactivii **PATHOZYME OESTRADIOL** conțin Proclin™ 300* în concentrație de 1% ca și conservant. Este toxică atunci cînd este ingerată. În caz de contact, spălați bine cu apă de la robinet și consultați un medic.
* Proclin™ 300 este o marcă înregistrată a ROHM & HAAS Limited.

DEPOZITARE

Reactivii trebuie depozitați la temperaturi de 2°C - 8°C.

Data expirării este ultima zi a lunii menționată pe eticheta recipientului și pe ambalajul kit-ului. Performanța kit-ului va fi cea specificată pînă la data expirării menționată așa cum este determinată de la data producerii și după cum este menționat pe kit și componentele acestuia. Nu folosiți reactivii după data expirării.

Evitați expunerea reactivilor la temperatură excesivă. Nu expuneți reactivii la lumina directă a soarelui.

NU CONGELAȚI NICI UN REACTIV (cu excepția depozitării standardelor) deoarece acesta va fi iremediabil alterat.

RECOLTAREA ȘI PREGĂTIREA PROBEI

Ser:
Recoltați o probă de sînge venos de la pacient și lăsați să se formeze și retracte cheagul. Centrifugați proba de sînge coagulat și colectați serul limpede. Este nevoie de ser proaspăt.

Plasmă:
Recoltați o probă de sînge venos într-un recipient de recoltare ce conține EDTA. Centrifugați proba și recoltați plasma limpede. Este nevoie de probe de plasmă proaspete.

Nu folosiți pentru testare ser hemolizat, contaminat sau lipemic deoarece aceasta va influența nedorit rezultatele.

Serul poate fi depozitat la 2°C - 8°C timp de 48 de ore înainte de testare. Dacă este nevoie de depozitare pe durată mai lungă, puteți păstra serul la -20°C pe o durată de 1 an. Probele decongelate trebuie amestecate bine înainte de a fi utilizate.

Nu folosiți ca și conservant Azida sodică deoarece aceasta va inhiba sistemul enzimatic Peroxidază.

Nu congelați-decongelați în mod repetat probele – veți obține rezultate false.

LIMITELE PROCEDURII

Folosirea altor tipuri de probe, altele decît serul sau plasma nu a fost validată pentru acest test. Nu există protocol de reutilizare pentru acest produs.

Atunci cînd faceți interpretarea testului este recomandat să luați în considerare toate datele clinice. Diagnosticul nu trebuie să fie stabilit doar pe baza rezultatelor unui singur test clinic.

PROCEDURA DE TESTARE

- Aduceți toate componentele kit-ului și serul de testat la temperatura camerei (20°C-25°C) înainte de a începe testarea.
- Se recomandă rularea unui set de standarde la fiecare procesare de probe. Fixați numărul dorit de godeuri în stativ. Înregistrați poziția standardelor și a serului de testat pe Fișa de Înregistrare a Datelor EIA.
- Stripurile nefolosite trebuie resigilate în punga de folie conținând desicant și plasate apoi la 2°C - 8°C.
- Pipetați 25μl de Standarde și de Ser de testat în godeurile stabilite.
- Pipetați 100μl de Conjugat Estradiol-HRP în fiecare godeu.
- Pipetați 50μl de reactiv iePURE anti-estradoli (E2) în fiecare godeu. Amestecați viguros timp de 30 de secunde. Este foarte important să amestecați complet.
- Incubați placa la temperatura camerei (20°C-25°C) timp de 90 de minute.
- Spălare Manuală La sfârșitul perioadei de incubare, aruncați conținutul godeurilor răsturnând brusc conținutul plăcii cu partea superioară în jos deasupra unui container de deșeurii cu risc biologic și apoi loviți placa (cu partea superioară în jos) pe o bucată de hirtie absorbantă. Aveți grijă ca în recipientul pentru deșeurii să se afle un dezinfectant corespunzător.
- Umpleți godeurile cu minimum 300μl de apă distilată pentru fiecare godeu. Întoarceți brusc placa deasupra recipientului de deșeurii biologice. Loviți placa de hirtie absorbantă. Spălați godeurile goale de 5 ori cu apă distilată.
- Loviți din nou placa (cu partea superioară în jos) de o bucată de hirtie absorbantă pentru a îndepărta toate picăturile de apă reziduală.
- Spălare Automată: controlați ca 300μl de apă distilată să fie pipetați în fiecare godeu și ca în recipientul cu deșeurii să fie adăugat un dezinfectant potrivit. Spălați godeurile de 5 ori. După spălare îndepărtați excesul de lichid lovind placa inversată de o hirtie absorbantă.
- Pipetați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu. Amestecați ușor timp de 5 secunde.
- Incubați la întuneric și la temperatura camerei (20°C-25°C) timp de 20 de minute.
- Opriti reacția adăugând 100μl de Soluție Stopare în fiecare godeu.
- Amestecați ușor timp de 30 de secunde. Este important să vă asigurați că vîrerea culorii de la albastru la galben are loc imediat.
- Citiți imediat densitatea optică (nu mai târziu de 10 minute) folosind un cititor de microplăci cu un filtru de 450nm.

EVITAREA ERORILOR

Poate fi folosit de personalul cu minimă pregătire bazică de laborator.

Nu folosiți componente ale kit-ului care sunt deteriorate sau contaminate.

Folosiți un vîrf de pipetă de unică folosință pentru fiecare probă pentru a preveni contaminarea încrucișată.

Deși nu este necesar să se recomandă rularea probelor și standardelor în duplicat.

Probele și standardele trebuie rulate simultan pentru a avea condiții de testare similare.

Se recomandă să nu folosiți mai mult de 32 de godeuri odată atunci cînd pipetați manual, deoarece pipetarea Standardelor și probelor trebuie să fie completă în decurs de 3 minute. Se poate folosi o placă completă de 96 de godeuri doar dacă este disponibilă pipetarea automată.

Puneți la loc capacul pe recipientele cu reactivi imediat după utilizare.

Evitați pipetarea repetată din reactivii de stoc, deoarece se poate produce contaminare.

Nu amestecați reactivii sau stripurile provenind de la kit-uri diferite. Atunci cînd pipetați aveți grijă să nu atingeți suprafața godeului. Nu pipetați reactivul pe partea laterală a godeului. Înainte de începutul testării, lăsați reactivii să ajungă la temperatura camerei (20° - 25°C). Amestecați ușor toți reactivii cu mișcări blînde de rotație.

Odată testarea pornită, godeurile nu trebuie să se usuce în cursul derulării testului.

Nu contaminați Soluția Substrat deoarece kit-ul va deveni nefuncțional.

Controlați precizia și acuratețea echipamentului de laborator folosit în timpul procedurii pentru a asigura rezultate reproductibile.

Strip-urile nefolosite ar trebui re-sigilate în punga de folie care conține desicant și apoi depozitate la 2°C - 8°C.

CALCULAREA REZULTATELOR

Calculați valoarea absorbantei medii (A_{450}) pentru fiecare set de Standarde, Controale și Probe.

Creați o curbă standard punct la punct făcînd un grafic cu absorbanta medie pentru fiecare Standard în funcție de concentrația în pg/ml punct la punct pe hirtie milimetrică liniar-liniară, cu valorile absorbantei pe axa Y și concentrațiile pe axa X.

Folosiți valorile absorbantei medii pentru fiecare probă pentru a determina concentrația corespunzătoare de Estradiol în pg/ml plecînd de la curva standard.

Dacă nivelurile controalelor sau ale probelor cu valori cunoscute nu dau rezultatele scontate, rezultatele testului trebuie considerate invalide.

Dacă folosiți un pachet software alegeți o curbă de regresie quadratică care să se potrivească.

VALORI PREDICȚIONATE ȘI SENSIBILITATE

Graficul produs de calibratori trebuie să aibă o formă hiperbolică cu densitatea optică (DO) citită la 450 nm invers proporțională cu concentrația lor. DO a calibratorului A trebuie să fie mai mare de 1,5 iar DO a calibratorului F mai mică de 0,75 pentru ca rezultatele testului să fie valide.

Fiecare laborator trebuie să stabilească propriul domeniu de valori normale plecînd de la populația de pacienți. PATHOZYME OESTRADIOL a fost realizat pe probe selectate aleator dintr-o policlinică.

Rezultatele acestor determinări sunt următoarele:

Males:	Adult	<60 pg/ml
Females:	Post menopauză	<18 pg/ml
	La ovulație, folicular timpuriu	30-100 pg/ml
	Folicular tîrziu	100-400 pg/ml
	Faza luteală	60-150 pg/ml
	Însărcinată, normal pînă la	up to 35,000 pg/ml
	Copii prepubertari normali	<10 pg/ml

SENSIBILITATE

Nivelul detectabil cel mai mic de Estradiol pentru acest test este 1pg/ml.

SPECIFICITATE

Următoarele substanțe au fost controlate pentru reactivitate încrucișată. Procentul indică reactivitatea încrucișată la înlocuire 50% comparat cu Estradiol.

În tabelul de mai jos sunt rezumate datele de reactivitate încrucișată pentru cîțiva steroizi endogeni și farmaceutici:

$$\text{Reactivitate încrucișată (\%)} = \frac{\text{Concentrația Estradiol Observată} \times 100}{\text{Concentrația Steroizi}}$$

Steroid	Reactivitate încrucișată
Oestradiol	100%
Oestrone	2.10%
Oestriol	1.50%
17a Oestriol	0.30%
Cortisol	<0.01%
Cortison	<0.01%
Progesteron	<0.01%
Testosterone	<0.01%
DHEA-Sulphate	<0.01%
5a Dihydrotestosterone	<0.01%

DATE DE EVALUARE

Rezultate calibrate cu competitori importanți și cu standarde referențiale.

Coefficientul de variație al PATHOZYME OESTRADIOL este mai mic sau egal cu 10%.

La o evaluare dintre kit-ul PATHOZYME OESTRADIOL produs de Omega și kit-ul Oestradiol DRG pentru probe cu niveluri între 17 și 1.351 pg/ml au fost generate următoarele date.

Număr de probe	174
Coefficient de Corelare	0,98
Panta	1,05
Intercept	- 3,67
Medie Omega	367 pg/ml
Medie DRG	279 pg/ml

Între kituri există o bună corelație.

BIBLIOGRAFIE

- Tsang, B. K., Armstrong, D. T. and Whitfield, J. F. Steroid Biosyntheses by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1407-1411;1980.
- Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D. T. Follicular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, Ed. Knobil, E. and Neill, J. et al. p331-385. Raven Press, New York. 1988.
- Hall, P. F. Testicular Steroid Synthesis: Organisation and Regulation. In: *The Physiology of Reproduction*, Ed. Knobil, E. and Neill, J. et al. p975-998. Raven Press, New York. 1982.
- Siteri, P.K., Murai, J. T., Hammon, G.L., Niskier, J. A., Raymoure, E. J. and Kuhn, R. W. The serum transport of steroid hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:457-510;1988.
- Martin, B., Rotten, D., Jolivet, A. and Gautray, J. P. Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35:443-447;1981.
- Bard, D. T. Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In: *The Endocrine Function of the Human Ovary*. Eds. James, V.H.T., Serio, M. and Giusti, G. p125-133. Academic Press, New York. 1976.
- McNastay, K. P., Baird, D. T., Bolton, A., Chambers, P., Corker, C. S. and McLean, H. Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle. *J. Endocrinol.* 71:77-85;1976.
- Abraham, G. E., Odell, W. D., Swerdloff, R. S. and Hopper, K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and oestradiol-17B during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-318;1972.
- March, C. M., Goebelsmann, U., Nakumara, R. M. and Mishell, D. R. Roles of Oestradiol and progesterone in eliciting midcycle luteinising hormone and follicle stimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol.* 49:507-512;1979.
- Simpson, E. R. and McDonald, P.C. Endocrinology of Pregnancy. In: *Textbook of Endocrinology*, Ed. Williams, R. H. p412-422. Saunders Company, Philadelphia. 1981.
- Jenner, M. R., Kelch, R. P. et al. Hormonal changes in prepubertal children, pubertal females in precocious puberty, premature thelarche, hypergonadism and in a child with feminising tumour. *J. Clin. Endocrinol.* 34:521;1982.
- Goldstein, D. et al. Correlation between oestradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil. Steril.* 37: 348-354;1982.
- Kirschner, M. A. The role of hormones in the etiology of human breast cancer. *Cancer.* 39:2716-2726;1977.
- Odell, W. D. and Swerdloff, R. D. Abnormalities of gonadal function in men. *Clin. Endocrinol.* 8:149-180;1978.
- McDonald, P.C., Madden, J.C., Brenner, P.F., Wilson, J. D. and Siteri, P. K. Origin of oestrogen in normal men and women with testicular feminisation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:905;1979.
- Peckham, M. J. and McElwain, T. J. Testicular tumours. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- Taubert, H. D. and Dericks-Tan, J. S. E. Induction of ovulation by clomiphene citrate in combination with high doses of estrogens or nasal application of LH-RH. In: *Ovulation in the Human*. Eds. Crosignani, P. G. and Mishell, D. R. p265-273. Academic Press, New York. 1976.
- Fishel, S. B., Edwards, R. G., Purdy, J. M., Steptoe, P.C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J., Fehilly, C., Hewitt, J. and Rowland, G. Implantation, abortion and birth after in-vitro stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 1:24-28;1985.
- Wransby, H., Sundstrom, P. and Leidholm, P. Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in-vitro fertilisation of stimulating cycles monitored by serum levels of estradiol and progesterone as sole index. *Human Reproduction.* 2:235-328;1987.
- Ratcliffe, W. A., Carter, G. D. et al. Estradiol assays: applications and guidelines for the provision of clinical biochemistry service. *Ann. Clin. Biochem.* 25:466-483;1988.
- Tietz, N. W. Textbook of Clinical Chemistry. Saunders. 1986.
- USA Centre for Disease Control/National Institute of Health Manual. **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories.** 1984.

GHID RAPID AL PROCEDURII DE TESTARE

- Pipetați 25μl de standarde, probe și controale în fiecare godeu.
- Adăugați 100μl de Conjugat Estradiol HRP în fiecare godeu.
- Adăugați 50μl de anticorpi anti Estradiol de iepure în fiecare godeu. Amestecați ușor 30 de secunde.
- Incubați 90 minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
- Aruncați conținutul godeurilor și spălați de cinci ori cu apă distilată.
- Adăugați 100μl de Soluție Substrat în fiecare godeu și amestecați bine 5 secunde.
- Incubați la întuneric 20 minute la temperatura camerei (20°C-25°C).
- Adăugați 100μl de Soluție de Stopare în fiecare godeu și amestecați ușor timp de 30 de secunde.
- Citiți imediat Densitatea Optică (nu mai târziu de 10 minute) cu ajutorul unui cititor de microplăci la 450nm.

8097 ISSUE 4A Revised October 2006 ROMANIAN
© Omega Diagnostics Ltd., 2006



OMEGA DIAGNOSTICS LTD.
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 AND ISO 13485 CERTIFIED COMPANY