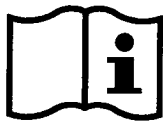


Product information

Information about other products is available at: www.demeditec.com



User's Manual

Estradiol ELISA

Enzyme immunoassay for the in-vitro diagnostic quantitative determination of Estradiol in human serum and plasma



DEH3355



96 Wells

CONTENTS / INHALTSVERZEICHNIS / CONTENIDO

1	INTRODUCTION	3
2	PRINCIPLE	3
3	WARNINGS AND PRECAUTIONS	4
4	REAGENTS	5
5	SPECIMEN	6
6	ASSAY PROCEDURE	6
7	EXPECTED VALUES	7
8	PERFORMANCE CHARACTERISTICS	8
9	LIMITATIONS OF PROCEDURE	9
10	LEGAL ASPECTS	9
11	REFERENCES	11
1	EINLEITUNG	12
2	TESTPRINZIP	12
3	VORSICHTSMAßNAHMEN	13
4	BESTANDTEILE DES KITS	14
5	PROBENVORBEREITUNG	15
6	TESTDURCHFÜHRUNG	15
7	ERWARTETE WERTE	16
8	ASSAY CHARACTERISTIKA	17
9	GRENZEN DES TESTS	17
10	RECHTLICHE GRUNDLAGEN	18
11	REFERENZEN	18
1	INTRODUCCIÓN	19
2	PRINCIPIO	19
3	ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES	20
4	REACTIVOS	21
5	MUESTRAS	22
6	PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO	22
7	VALORES ESPERADOS	23
8	CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO	24
9	LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO	25
10	ASPECTOS LEGALES	26
11	REFERENCIAS	27
	SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA	28

1 INTRODUCTION

1.1 Intended Use

The **DEMEDIATEC Estradiol ELISA** is a competitive immunoassay for the quantitative measurement of estradiol in serum and plasma (EDTA).

1.2 Summary and explanation

Estradiol (1,3,5(10)-estratriene-3,17 β -diol; 17 β -estradiol; E2) is a C18 steroid hormone with a phenolic A ring. This steroid hormone has a molecular weight of 272.4. It is the most potent natural Estrogen, produced mainly by the Graffian follicle of the female ovary and the placenta, and in smaller amounts by the adrenals, and the male testes (1,2,3).

Estradiol (E2) is secreted into the blood stream where 98% of it circulates bound to sex hormone binding globulin (SHBG) and to a lesser extent to other serum proteins such as albumin. Only a small fraction circulates as free hormone or in the conjugated form (4,5). Estrogenic activity is affected via estradiol-receptor complexes which trigger the appropriate response at the nuclear level in the target sites. These sites include the follicles, uterus, breast, vagina, urethra, hypothalamus, pituitary and to a lesser extent the liver and skin.

In non-pregnant women with normal menstrual cycles, estradiol secretion follows a cyclic, biphasic pattern with the highest concentration found immediately prior to ovulation (6,7). The rising estradiol concentration is understood to exert a positive feedback influence at the level of the pituitary where it influences the secretion of the gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH), and luteinizing hormone (LH), which are essential for follicular maturation and ovulation, respectively (8,9). Following ovulation, estradiol levels fall rapidly until the luteal cells become active resulting in a secondary gentle rise and plateau of estradiol in the luteal phase. During pregnancy, maternal serum Estradiol levels increase considerably, to well above the pre-ovulatory peak levels and high levels are sustained throughout pregnancy (10).

Serum Estradiol measurements are a valuable index in evaluating a variety of menstrual dysfunctions such as precocious or delayed puberty in girls (11) and primary and secondary amenorrhea and menopause (12). Estradiol levels have been reported to be increased in patients with feminising syndromes (14), gynaecomastia (15) and testicular tumors (16).

In cases of infertility, serum Estradiol measurements are useful for monitoring induction of ovulation following treatment with, for example, clomiphene citrate, LH-releasing hormone (LH-RH), or exogenous gonadotropins (17,18). During ovarian hyperstimulation for in vitro fertilisation (IVF), serum estradiol concentrations are usually monitored daily for optimal timing of human chorionic gonadotropin (hCG) administration and oocyte collection (19).

2 PRINCIPLE

The DEMEDIATEC Estradiol ELISA Kit is a solid phase enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), based on the principle of competitive binding.

The microtiter wells are coated with an anti-Estradiol antibody. An unknown amount of estradiol present in the sample competes with an Estradiol-horseradish peroxidase conjugate for binding to the coated antibody. After incubation the unbound conjugate is washed off. The amount of bound peroxidase conjugate is inversely proportional to the concentration of Estradiol in the sample. After addition of the substrate solution, the intensity of color developed is inversely proportional to the concentration of Estradiol in the sample.

3 WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the samples will not be affected.
9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REAGENTS

4.1 Reagents provided

1. **SORB MT Microtiter Plate**, 12 x 8 (break apart) strips with 96 wells;
Wells coated with anti-Estradiol antibody.
2. **CAL 0-5 Calibrators (Calibrator 0-5)**, 6 vials, 0.3 ml each, ready to use;
Concentrations: 0 – 25 – 75 – 225 – 675 – 2000 pg/ml
3. **CONTROL 1-2 Control 1 (low) / Control 2 (high)**, 2 vials, 0.3 ml each, ready to use;
containing Estradiol in human serum-buffer matrix.
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet
4. **ENZ CONJ Enzyme Conjugate**, 1 vial, 11 ml, ready to use;
17 β -Estradiol labeled horseradish peroxidase in buffered matrix.
5. **SUB TMB Substrate Solution**, 1 vial, 22 ml, ready to use;
contains tetramethylbenzidine (TMB).
6. **STOP SOLN Stop Solution**, 1 vial, 7 ml, ready to use;
contains 2 N hydrochloric acid solution.
7. **WASH SOLN 10x Wash Solution**, 1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see "Reagent Preparation".

Note: Additional Calibrator 0 for sample dilution is available upon request.

4.2 Materials required but not provided

- A microtiter plate reader capable for endpoint measurement at 450 nm
- Calibrated variable precision micropipettes (25 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l).
- Microplate mixer operating at more than 600 rpm
- Absorbent paper
- Distilled or deionized water
- Timer
- Semi logarithmic graph paper or software for data reduction

4.3 Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°-8°C. After first opening the reagents are stable for 30 days if used and stored properly.

Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

4.4 Reagent preparation

Allow the reagents and the required number of wells to reach room temperature (21-26°C) before starting the test.

Wash Solution:

Dilute 50 ml of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 ml deionized water to a final volume of 500 ml. *The diluted Wash Solution is stable for at least 12 weeks at room temperature (21-26°C).*

4.5 Disposal of the kits

The disposal of the kit must be made according to the national regulations. Special information for this product is given in the Material Safety Data Sheet.

4.6 Damaged test kits

In case of any severe damage of the test kit or components, DEMEDITEC has to be informed in writing within one week after receiving the kit. Severely damaged single components should not be used for a test run. They have to be stored until a final solution has been found. After this, they should be disposed according to the official regulations.

5 SPECIMEN

For determination of estradiol **serum or plasma (EDTA)** can be used. The procedure calls for 25 µl sample per well. The samples should be assayed immediately or aliquoted and stored at ≤ -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles. Samples expected to contain estradiol concentrations higher than the highest calibrator (2000 pg/ml) should be diluted with the zero calibrator before assay. The additional dilution step has to be taken into account for the calculation of the results. Do not use grossly haemolytic, icteric or grossly lipaemic specimens.

6 ASSAY PROCEDURE

6.1 General Remarks

- All reagents and specimens must be allowed to come to room temperature before use. All reagents must be mixed without foaming.
- Once the test has been started, all steps should be completed without interruption.
- Use new disposal plastic pipette tips for each standard, control or sample in order to avoid cross contamination.
- Absorbance is a function of the incubation time and temperature. Before starting the assay, it is recommended that all reagents are ready, caps removed, all needed wells secured in holder, etc. This will ensure equal elapsed time for each pipetting step without interruption.
- As a general rule the enzymatic reaction is linearly proportional to time and temperature.
- Respect the incubation times as stated in this instructions for use.

6.2 Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate calibrators and samples in duplicates.
2. Dispense **25 µl** of each **Calibrator, Sample and Control** with new disposable tips into appropriate wells.
3. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a plate shaker (> 600 rpm).
4. Add **100 µl of Enzyme Conjugate** into each well.
5. Incubate for **60 minutes** at room temperature on a plate shaker (> 600 rpm)

Important Note:

Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!

6. Discard the content of the wells and rinse the wells **4 times** with diluted **Wash Solution** (300 µl per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
7. Add **200 µl** of **Substrate Solution** to each well.
8. Incubate without shaking for **30 minutes** in the dark.
9. Stop the reaction by adding **50 µl** of **Stop Solution** to each well.
10. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

6.3 Calculation of results

1. Calculate the average absorbance values for each set of calibrators, controls and samples.
2. Using semi logarithmic graph paper, construct a standard curve by plotting the mean absorbance obtained from each standard against its concentration with absorbance value on the vertical (Y) axis and concentration on the horizontal (X) axis.
3. Using the mean absorbance value for each sample and control, determine the corresponding concentration from the calibration curve.
4. Automated method: The results in the package insert have been calculated automatically using a 4 PL (4 Parameter Logistics) curve fit. 4 Parameter Logistics is the preferred calculation method. Other data reduction functions may give slightly different results.
5. The concentration of the samples can be determined directly from this calibrator curve. Samples with concentrations higher than that of the highest calibrator have to be further diluted. For the calculation of the concentrations, this dilution factor has to be taken into account.

Example of typical calibrator curve

Following data are intended for illustration only and should not be used to calculate results from another run.

Calibrator	Optical Units (450nm)
Calibrator 0 (0 pg/ml)	2.738
Calibrator 1 (25 pg/ml)	2.439
Calibrator 2 (75 pg/ml)	1.999
Calibrator 3 (225 pg/ml)	1.320
Calibrator 4 (675 pg/ml)	0.711
Calibrator 5 (2000 pg/ml)	0.346

7 EXPECTED VALUES

It is strongly recommended that each laboratory should establish its own normal ranges.

In a study conducted with apparently normal healthy adults, using the Demeditec Estradiol ELISA the following values are observed:

Population	Age	5%-95% Percentile
Males	< 50 years	n.d. – 36.2 pg/ml
	> 50 years	n.d. – 51.1 pg/ml
Females	< 50 years	n.d. – 111.4 pg/ml
	> 50 years	n.d. – 37.9 pg/ml

n.d.= non detectable

The values provided here were determined without consideration of the phase of menstrual cycle. The results alone should not be the only reason for any therapeutic consequences. The results should be correlated to other clinical observations and diagnostic tests.

8 PERFORMANCE CHARACTERISTICS

8.1 Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of Estradiol that can be distinguished from the Zero Calibrator is 6.2 pg/ml at the 2SD confidence limit.

8.2 Specificity (Cross Reactivity)

The following materials have been evaluated for cross reactivity. The percentage indicates cross reactivity at 50% displacement compared to Estradiol.

Steroid	% Cross reaction
Androstenedione	< 0.1
17-Hydroxyprogesterone	< 0.1
Corticosterone	< 0.1
Estriol	0.4
Estrone	4.2
Pregnenolone	< 0.1
E2-3-Glucuronide	3.8
E2-3-Sulphate	3.6
E2-17-Glucuronide	< 0.1
Progesterone	< 0.1
Testosterone	< 0.1
Fulvestrant	9.5

8.3 Assay dynamic range

The range of the assay is between 25 – 2000 pg/ml.

8.4 Reproducibility

8.4.1 Intra-Assay

The intra-assay variation was determined by 20 replicate measurements of three serum samples within one run. The within-assay variability is shown below:

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (pg/ml)	83.8	269.9	794.8
SD	5.3	8.5	29.5
CV (%)	6.4	3.1	3.7
n =	20	20	20

8.4.2 Inter-Assay

The inter-assay (between-run) variation was determined by duplicate measurements of three serum samples in 10 different tests.

	Serum 1	Serum 2	Serum 3
Mean (pg/ml)	85.2	251.3	727.8
SD	4.7	11.7	32.6
CV (%)	5.5	4.7	4.5
n =	10	10	10

8.5 Recovery

Using the calibrator matrix two spiking solutions of 100 ng/ml and 10 ng/ml were prepared. Three sera (1-3) were spiked with 10 and 25 μ l of the 10 ng/ml solution and with 6 μ l of the 100 ng/ml solution leaving the serum matrices relatively intact. All samples were measured by the DEMEDITEC Estradiol ELISA procedure.

Sample	Spiking (pg/ml)	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Recovery (%)
1	-	27.8	-	-
	100	141.3	127.8	111%
	250	315.0	277.8	113%
	600	685.0	627.8	109%
2	-	10.3	-	-
	100	119.3	110.3	108%
	250	267.4	260.3	103%
	600	710.3	610.3	116%
3	-	4.2	-	-
	100	98.7	104.2	95%
	250	267.3	254.2	105%
	600	668.1	604.2	111%

8.6 Linearity

Three serum samples were assayed undiluted and diluted with the zero calibrator.

Serum	Dilution	Measured (pg/ml)	Expected (pg/ml)	Linearity (%)
1	-	715.9	./.	./.
	1 in 2	321.3	358.0	90%
	1 in 4	164.4	179.0	92%
	1 in 8	88.9	89.5	99%
2	-	1012.7	./.	./.
	1 in 2	553.3	506.4	109%
	1 in 4	306.0	253.2	121%
	1 in 8	146.8	126.6	116%
3	-	1099.2	./.	./.
	1 in 2	583.4	549.6	106%
	1 in 4	316.1	274.8	115%
	1 in 8	165.0	137.4	120%

9 LIMITATIONS OF PROCEDURE

Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is performed with a complete understanding of the package insert instruction and with adherence to good laboratory practice. Any improper handling of samples or modification of this test might influence the results.

Drug Interferences

Any medication (cream, oil, pill etc.) containing Estradiol will significantly influence the measurement of this analyte.

The Estradiol ELISA should not be used for patients being treated with the drug fulvestrant (Faslodex[®]) which cross reacts in the Estradiol ELISA and could lead to falsely elevated test results

10 LEGAL ASPECTS

10.1 Reliability of Results

The test must be performed exactly as per the manufacturer's instructions for use. Moreover the user must strictly adhere to the rules of GLP (Good Laboratory Practice) or other applicable national standards and/or laws. This is especially relevant for the use of control reagents. It is important to always include, within the test procedure, a sufficient number of controls for validating the accuracy and precision of the test.

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications. In case of any doubt or concern please contact DEMEDITEC.

10.2 Therapeutic Consequences

Therapeutic consequences should never be based on laboratory results alone even if all test results are in agreement with the items as stated under point 10.1. Any laboratory result is only a part of the total clinical picture of a patient.

Only in cases where the laboratory results are in acceptable agreement with the overall clinical picture of the patient should therapeutic consequences be derived.

The test result itself should never be the sole determinant for deriving any therapeutic consequences.

10.3 Liability

Any modification of the test kit and/or exchange or mixture of any components of different lots from one test kit to another could negatively affect the intended results and validity of the overall test. Such modification and/or exchanges invalidate any claim for replacement.

Claims submitted due to customer misinterpretation of laboratory results subject to point 10.2. are also invalid. Regardless, in the event of any claim, the manufacturer's liability is not to exceed the value of the test kit. Any damage caused to the test kit during transportation is not subject to the liability of the manufacturer.

11 REFERENCES

1. 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 - 11 (1980).
2. 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., pp. 331-85. *Raven Press*, New York (1988).
3. Hall, P.F., Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. In: The Physiology of Reproduction, Ed.: Knobil, E., and Neill, J. et al., pp 975-98. *Raven Press*, New York (1988).
4. Siiteri, P.K. Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. and Kuhn, R.W., The serum transport of steroid hormones, *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:457 - 510 (1982).
5. 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: 443-47 (1981).
6. Baird, 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. pp. 125-33, *Academic Press*, New York (1976).
7. McNastty, 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).
8. Abraham, G.E., Odell, W.D., Swerdloff, R.S. and Hopper, K., Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-18 (1972).
9. 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. Metab.* 49:507-12 (1979).
10. Simpson, E.R. and McDonald, P.C., Endocrinology of Pregnancy. In: Textbook of Endocrinology, Ed.: Williams, R.H. pp412-22, *Saunders Company*, Philadelphia (1981).
11. Jenner, M.R., Kelch, R.P., et al., Hormonal Changes in prepubertal children, pubertal females and in precocious puberty, premature thelarche, hypogonadism and in a child with feminising tumour, *J. Clin. Endocrinol.* 34: 521 (1982).
12. Goldstein, D. et al., Correlation between oestradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency, *Fertil. Steril.* 37: 348-54 (1982).
13. Kirschner, M.A., The role of hormones in the etiology of human breast cancer, *Cancer* 39:2716 26 (1977).
14. Odell, W.D. and Swerdloff, R.D., Abnormalities of gonadal function in men, *Clin. Endocr.* 8:149-80 (1978).
15. McDonald, P.C., Madden, J.C., Brenner, P.F., Wilson, J.D. and Siiteri, P.K. Origin of oestrogen in normal men and women with testicular feminisation, *J.Clin. Endocrinol. Metabol.* 49:905 (1979).
16. Peckham, M.J: and McElwain, T.J., Testicular tumours, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 4:665-692 (1975).
17. Taubert, H.D. and Dericks-Tan, J.S.E., Induction of ovulation by clomiphene citrate in combination with high doses of oestrogens or nasal application of LH-RH. In: Ovulation in the Human. Eds.: Crosignandi, P.G. and Mishell, D.R., pp.265-73, *Academic Press*, New York (1976).
18. 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 fertilisation using the natural menstrual cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin, *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1:24-28 (1985).
19. Wramsby, H., Sundstorm, 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 oestradiol and progesterone as sole index. *Human Reproduction* 2: 325-28 (1987).
20. Ratcliff, 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).
21. Tietz, N.W., *Textbook of Clinical Chemistry*. Saunders, 1986.

1 EINLEITUNG

Der DEMEDITEC Estradiol ELISA ist ein kompetitiver Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Estradiol in Serum und Plasma (EDTA). Nur für In-vitro Diagnostik.

2 TESTPRINZIP

Der DEMEDITEC Estradiol ELISA ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay, der auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung basiert. Die Vertiefungen der Mikrotiterplatten sind mit einem Antikörper beschichtet, der gegen das Estradiol-Molekül gerichtet ist.

Die Proben werden in die beschichteten Vertiefungen gegeben und zusammen mit einem Estradiol-Enzymkonjugat inkubiert. Während der Inkubation konkurriert das Estradiol aus der Probe mit dem Estradiol-Enzymkonjugat um die freien Bindungsstellen des Antikörpers auf den beschichteten Vertiefungen. Das nicht gebundene Konjugat wird durch Waschen der Vertiefungen entfernt. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben und die Farbentwicklung nach einer definierten Zeit gestoppt. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional der Estradiol-Konzentration in der Probe. Die Extinktion wird bei 450 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät gemessen.

3 VORSICHTSMAßNAHMEN

1. Dieser Kit ist nur zum in vitro diagnostischen Gebrauch geeignet und sollte nur von Fachpersonal durchgeführt werden.
2. Lesen Sie vor dem Testansatz sorgfältig die Packungsbeilage. Verwenden Sie nur die gültige, im Testkit enthaltene Arbeitsanleitung.
3. Die Mikrotiterplatte enthält teilbare, einzeln brechbare Mikrotiterstreifen. Unbenutzte Mikrotiterstreifen sollten im verschlossenen Folienbeutel bei 2 – 8°C aufbewahrt werden und im mitgelieferten Rahmen verwendet werden.
4. Proben und Reagenzien sollten so schnell wie möglich und in einer gleichbleibenden Sequenz pipettiert werden.
5. Verwenden Sie für jedes Reagenz einen separaten Pipettenaufsatz. Das gilt besonders für die Substrat-Lösung. Wenn der Pipettenaufsatz der Substrat-Lösung vorher z.B. für das Konjugat verwendet wurde, kommt es zu einem Farbumschlag der Substrat-Lösung. Gießen Sie Reagenzien nie zurück ins Fläschchen, da so Reagenz-Kontaminationen verursacht werden können.
6. Mischen Sie den Inhalt der Mikrotiterplatte sorgfältig, um gute Testergebnisse zu gewährleisten. Mikrotiterplatten nicht wiederverwenden!
7. Mikrotiterstreifen nicht austrocknen lassen während des Testlaufes. Nach jedem Waschschrift zügig im Testprotokoll fortfahren.
8. Bringen Sie die Reagenzien vor Ansetzen des Tests auf Raumtemperatur (21-26°C).
9. Nicht mit dem Mund pipettieren und den Kontakt von Kitbestandteilen und Proben mit Haut und Schleimhäuten vermeiden.
10. In den Bereichen, in denen Proben oder Kitbestandteile verwendet werden, nicht rauchen, essen oder Kosmetika verwenden.
11. Beim Umgang mit Proben oder Reagenzien Einweg-Latexhandschuhe tragen. Die Verunreinigung von Reagenzien oder Proben mit Mikroben kann zu falschen Ergebnissen führen.
12. Der Gebrauch sollte in Übereinstimmung mit den Verfahren erfolgen, welche durch eine nationale Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie festgelegt sind.
13. Reagenzien nicht nach dem auf dem Kit-Etikett angegebenen Verfallsdatum verwenden.
14. Alle in der Packungsbeilage angegebenen Mengen müssen genau eingehalten werden. Optimale Ergebnisse können nur durch Verwendung kalibrierter Pipetten und Mikrotiterplatten-Lesegeräte erreicht werden.
15. Komponenten von Kits mit unterschiedlichen Lotnummern nicht untereinander vertauschen oder mischen. Es wird empfohlen, keine Vertiefungen von verschiedenen Platten zu verwenden, auch nicht, wenn es sich um das gleiche Lot handelt. Die Kits können unter anderen Bedingungen gelagert oder versendet worden sein, so dass die Bindungscharakteristika der Platten leicht unterschiedlich ausfallen.
16. Der Kontakt mit der Stopplösung sollte vermieden werden, da sie Hautreizungen und Verbrennungen verursachen kann.
17. Die Entsorgung aller Bestandteile sollte gemäß der Vorschriften einer entsprechenden nationalen Gefahrenstoff-Sicherheitsrichtlinie erfolgen.
18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt von der Firma Demeditec Diagnostics GmbH erhältlich.

4 BESTANDTEILE DES KITS

4.1 Kitinhalt

1. **SORB | MT** Mikrotiterplatte, 12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen beschichtet mit einem anti-Estradiol-Antikörper.
2. **CAL | 0-5** Standard (Standard 0-5), 6 Fläschchen, je 0,3 ml, gebrauchsfertig; Konzentrationen: 0 – 25 – 75 – 225 – 675 – 2000 pg/ml
3. **CONTROL | 1-2** Kontrolle 1 (niedrig) / Kontrolle 2 (hoch), 2 Fl., je 0.3 ml, gebrauchsfertig; enthält Estradiol in humaner Serum-Puffer Matrix. Kontrollwerte und –bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.
4. **ENZ | CONJ** Enzymkonjugat, 1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig; 17 β -Estradiol mit Meerrettichperoxidase konjugiert
5. **SUB | TMB** Substratlösung, 1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; enthält Tetramethylbenzidin (TMB)
6. **STOP | SOLN** Stopplösung, 1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure.
7. **WASH | SOLN | 10x** Waschlösung, 1 Fläschchen, 50 ml (10X konzentriert); siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

Anmerkung: Zusätzlicher *Standard 0* zur Probenverdünnung ist auf Anfrage erhältlich.

4.2 Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

- Kalibriertes Mikrotiterplatten-Lesegerät mit 450 \pm 10 nm Filter
- Kalibrierte variable Präzisions-Mikropipetten (25 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l)
- Mikrotiterplatten-Schüttler mit mehr als 600 rpm
- Saugfähiges Papier
- Aqua dest.
- Zeitnahmegerät
- Semilogarithmisches Papier oder Software zur Datenverarbeitung

4.3 Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C gelagert werden. Nach dem ersten Öffnen sind die Reagenzien bei sachgemäßer Abarbeitung und Lagerung 30 Tage stabil.

Die Mikrotiterstreifen sollten bei 2-8°C gelagert werden. Der einmal geöffnete Folienbeutel sollte stets sehr sorgfältig wieder verschlossen werden.

4.4 Vorbereitung der Reagenzien

Alle Reagenzien sowie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen sollen vor dem Gebrauch auf Raumtemperatur (21-26°C) gebracht werden.

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (21-26°C) für mindestens 12 Wochen stabil.*

4.5 Entsorgung des Kits

Die Entsorgung des Kits muss gemäß den nationalen gesetzlichen Vorschriften erfolgen. Spezielle Informationen für dieses Produkt finden Sie im Material Sicherheitsdatenblatt.

4.6 Beschädigte Testkits

Im Falle einer starken Beschädigung des Testkits oder der Komponenten muss die Firma DEMEDITEC DIAGNOSTICS GmbH in schriftlicher Form spätestens eine Woche nach Erhalt des Kits informiert werden. Stark beschädigte Einzelkomponenten sollten nicht für den Testlauf verwendet werden. Sie müssen gelagert werden, bis eine endgültige Lösung gefunden wurde. Danach sollten sie gemäß den offiziellen Richtlinien entsorgt werden.

5 PROBENVORBEREITUNG

Zur Bestimmung von Estradiol ist **Serum und Plasma (EDTA)** geeignet. Für eine Bestimmung werden 25 µl Probenvolumen benötigt. Die Proben sollten unverzüglich verwendet werden oder aliquotiert bei ≤ -20°C gelagert werden. Wiederholte Gefrierzyklen sollten vermieden werden. Proben mit einer erwarteten Estradiol-Konzentration höher als der höchste Standard (2000 pg/ml) sollten vor Durchführung des Tests mit Nullstandard verdünnt werden. Die zusätzliche Verdünnung muss in die Kalkulation der Ergebnisse mit berücksichtigt werden. Keine hämolytischen, ikterischen oder lipämischen Proben verwenden.

6 TESTDURCHFÜHRUNG

6.1 Allgemeine Hinweise

- Alle Reagenzien und Proben müssen vor Gebrauch auf Raumtemperatur (21-26°C) gebracht und gut durchgemischt werden. Dabei sollte Schaumbildung vermieden werden.
- Wenn die Testdurchführung einmal begonnen wurde, muss sie ohne Unterbrechung zu Ende geführt werden.
- Für jeden Standard, jede Kontrolle oder Probe sollte eine neue Pipettenspitze verwendet werden, um Verschleppungen zu vermeiden.
- Die Optische Dichte ist abhängig von Inkubationszeit und Temperatur. Deshalb ist es notwendig, vor Beginn der Testdurchführung alle Reagenzien in einen arbeitsbereiten Zustand zu bringen, die Deckel der Fläschchen zu öffnen, alle benötigten Vertiefungen in den Halter zu setzen. Nur eine solche Vorbereitung garantiert gleiche Zeiten für jeden Pipettiervorgang ohne Pausen.
- Als generelle Regel gilt, dass die enzymatische Reaktion linear proportional zu Zeit und Temperatur ist.
- Die in der Gebrauchsanweisung angegebenen Inkubationszeiten müssen eingehalten werden.

6.2 Testdurchführung

Jeder Testlauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an **Mikrotiterstreifen** in der Halterung befestigen.
2. Je **25 µl Standards, Kontrollen und Proben** mit neuen Plastikspitzen in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. **60 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (>600 rpm) inkubieren.
4. **100 µl des Enzymkonjugates** in jede Vertiefung geben.
5. **60 Minuten** bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (>600 rpm) inkubieren.

Achtung:

Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!

6. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen **4mal** mit verdünnter **Waschlösung** (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
7. **200 µl Substratlösung** in jede Vertiefung geben.
8. **30 Minuten** bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von **50 µl Stopp-Lösung** in jede Vertiefung abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei **450±10 nm** mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

6.3 Ergebnisermittlung

1. Die durchschnittlichen Werte der Optischen Dichte (OD) für jedes Set von Standards und Proben bestimmen.
2. Eine Standardkurve ermitteln durch Auftragen der mittleren Optischen Dichte jedes Standards gegen die Konzentration, wobei der OD-Wert auf der vertikalen (Y) Achse und die Konzentration auf der horizontalen (X) Achse eingetragen wird.
3. Unter Verwendung der mittleren OD wird für jede Probe die entsprechende Konzentration aus der Standardkurve ermittelt.
4. Automatische Methode: Die in der Arbeitsanleitung ermittelten Werte wurden automatisch mit Hilfe der 4 Parameter Gleichung (4PL, 4 Parameter Logistics, 4 Parameter Rodbard) bestimmt. Andere Auswertungsfunktionen können leicht abweichende Werte ergeben.
5. Die Konzentration der Proben kann direkt von der Standardkurve abgelesen werden. Proben, die eine höhere Konzentration als die des höchsten Standards enthalten, müssen verdünnt werden. Dieser Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung der Konzentration beachtet werden.

Beispiel für eine Standardkurve

Nachfolgend wird ein typisches Beispiel für eine Standardkurve mit dem DEMEDITEC Estradiol ELISA gezeigt. Diese darf aber nicht zur Kalkulation eines anderen Testlaufes verwendet werden.

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard 0 (0 pg/ml)	2.738
Standard 1 (25 pg/ml)	2.439
Standard 2 (75 pg/ml)	1.999
Standard 3 (225 pg/ml)	1.320
Standard 4 (675 pg/ml)	0.711
Standard 5 (2000 pg/ml)	0.346

7 ERWARTETE WERTE

In einer Studie wurden die Proben von gesunden Erwachsenen untersucht. Dabei ergaben sich mit dem Demeditec Estradiol ELISA folgende Werte:

Population	Alter	5%-95% Perzentile
Männer	< 50 Jahre	n.d. – 36,2 pg/ml
	> 50 Jahre	n.d. – 51,1 pg/ml
Frauen	< 50 Jahre	n.d. – 111,4 pg/ml
	> 50 Jahre	n.d. – 37,9 pg/ml

n.d. = nicht detektierbar

Bei der Ermittlung der Normbereiche wurde die Phase des Ovarialzyklus nicht berücksichtigt. Therapeutische Konsequenzen sollten nicht allein auf Basis der mit diesem Test ermittelten Werte getroffen werden, sondern unter Berücksichtigung klinischer Beobachtungen und weiterer diagnostischer Tests. Es wird empfohlen, dass jedes Labor seine eigenen normalen und abnormalen Werte ermittelt.

8 ASSAY CHARACTERISTIKA

8.1 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität, definiert als Mittelwert minus der zweifachen Standardabweichung des Standards 0, beträgt 6,2 pg/ml.

8.2 Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

8.3 Messbereich

Der Messbereich des Testes liegt zwischen 25 – 2000 pg/ml.

Die Daten zu:

8.4 Präzision

8.5 Wiederfindung

8.6 Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

9 GRENZEN DES TESTS

Jede unsachgemäße Behandlung von Proben oder Modifikationen dieses Tests können die Ergebnisse beeinflussen.

Beeinflussung durch Medikamente

Medikationen wie Cremes, Öle oder Pillen, die Estradiol enthalten, haben einen entsprechenden Einfluss auf die Bestimmung des Analyten.

Der Estradiol ELISA sollte bei Patienten, die mit Fulvestrant (Faslodex[®]) behandelt werden, nicht eingesetzt werden, da Fulvestrant im Estradiol ELISA kreuzreagiert. Dadurch kann es zu falsch erhöhten Testergebnissen kommen.

10 RECHTLICHE GRUNDLAGEN

10.1 Zuverlässigkeit der Ergebnisse

Der Test muss exakt gemäß der Testanleitung des Herstellers abgearbeitet werden. Darüber hinaus muss der Benutzer sich strikt an die Regeln der GLP (Good Laboratory Practice) oder andere eventuell anzuwendende Regeln oder nationale gesetzliche Vorgaben halten. Dies betrifft besonders den Gebrauch der Kontrollreagenzien. Es ist sehr wichtig, bei der Testdurchführung stets eine ausreichende Anzahl Kontrollen zur Überprüfung der Genauigkeit und Präzision mitlaufen zu lassen.

Die Testergebnisse sind nur gültig, wenn alle Kontrollen in den vorgegebenen Bereichen liegen, und wenn alle anderen Testparameter die vorgegebenen Spezifikationen für diesen Assay erfüllen. Wenn Sie bezüglich eines Ergebnisses Zweifel oder Bedenken haben, setzen Sie sich bitte mit der Firma DEMEDITEC in Verbindung.

10.2 Therapeutische Konsequenzen

Therapeutische Konsequenzen sollten keinesfalls nur aufgrund von Laborergebnissen erfolgen, selbst dann nicht, wenn alle Testergebnisse mit den in 10.1. genannten Voraussetzungen übereinstimmen. Jedes Laborergebnis ist nur ein Teil des klinischen Gesamtbildes eines Patienten. Nur in Fällen, in denen die Laborergebnisse in akzeptabler Übereinstimmung mit dem allgemeinen klinischen Bild des Patienten stehen, sollten therapeutische Konsequenzen eingeleitet werden. Das Testergebnis allein sollte niemals als alleinige Grundlage für die Einleitung therapeutischer Konsequenzen dienen.

10.3 Haftung

Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge. Reklamationen, die aufgrund von Falschinterpretation von Laborergebnissen durch den Kunden gemäß Punkt 10.2. erfolgen, sind ebenfalls abzuweisen. Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers

11 REFERENZEN

Angaben zu den Referenzen entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Intención de Uso

El **DEMEDIATEC Estradiol ELISA** es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa de Estradiol en suero y plasma (EDTA) humano.

1.2 Resumen y Explicación

Estradiol (1,3,5 (10) estratrieno-3,17 β -diol; 17 β -estradiol; E2) es una hormona esteroide C18 con un anillo fenólico A. Esta hormona esteroide tiene un peso molecular de 272,4 kD. Es el más potente estrógeno natural, producido principalmente por el folículo de Graff del ovario y la placenta, y en menor cantidad por las glándulas suprarrenales y los testículos (1,2,3).

Estradiol (E2) se secreta en el torrente sanguíneo, donde el 98% de lo que circula lo hace unida a la globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) y en menor medida a otras proteínas séricas tales como albúmina. Sólo una pequeña fracción circula como hormona libre o en la forma conjugada (4,5). La actividad estrogénica se ve afectada a través de complejos de estradiol-receptores que desencadenan la respuesta apropiada a nivel nuclear en los sitios diana. Estos sitios incluyen los folículos, útero, mama, vagina, la uretra, hipotálamo, pituitaria y en menor medida, el hígado y la piel.

En las mujeres no embarazadas con ciclos menstruales normales, la secreción de estradiol sigue un patrón cíclico, bifásica con la concentración más alta se encuentra inmediatamente antes de la ovulación (6,7). El aumento de la concentración de estradiol se entiende que ejerce una influencia de retroalimentación positiva a nivel de la pituitaria en el que influye en la secreción de las gonadotropinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH), que son esenciales para la maduración folicular y la ovulación, respectivamente (8,9). Después de la ovulación, los niveles de estradiol caen rápidamente hasta que las células lúteas se vuelven activas resultando en un aumento secundario suave y la meseta de estradiol en la fase lútea. Durante el embarazo, los niveles de estradiol en suero materno aumentan considerablemente, muy por encima de los niveles máximos pre-ovulatorios y los niveles altos se mantienen durante todo el embarazo (10).

Mediciones en suero de estradiol son un índice de valor en la evaluación de una variedad de disfunciones menstruales como la pubertad precoz o retrasada en las niñas (11) y amenorrea primaria y secundaria y la menopausia (12). Los niveles de estradiol se han reportado ser aumentado en pacientes con síndromes feminizantes (14), ginecomastia (15) y tumores testiculares (16).

En los casos de infertilidad, las mediciones de estradiol sérico son útiles para el seguimiento de inducción de la ovulación después del tratamiento con, por ejemplo, citrato de clomifeno, hormona (LH-RH), o gonadotropinas exógenas (17,18) LH-liberación. Durante la hiper estimulación ovárica para la fertilización in vitro (FIV), las concentraciones séricas de estradiol son monitoreados por lo general todos los días para el momento óptimo de la administración gonadotropina coriónica humana (hCG) y recaudación de los ovocitos (19).

2 PRINCIPIO

El Kit DEMEDIATEC Estradiol ELISA es un ensayo inmunoenzimático una fase sólida ligado a enzima (ELISA), basado en el principio de unión competitiva.

Los pocillos de microtitulación se recubren con un anticuerpo anti-estradiol. Una cantidad desconocida de estradiol presente en la muestra compite con un conjugado de peroxidasa de rábano picante-estradiol por la unión al anticuerpo recubierto. Después de la incubación del conjugado no unido se lava. La cantidad de conjugado de peroxidasa unida es inversamente proporcional a la concentración de estradiol en la muestra. Después de la adición de la solución de sustrato, la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la concentración de estradiol en la muestra.

3 ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Este KIT es sólo para uso diagnóstico in vitro. Sólo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo, lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Use la versión válida del prospecto proporcionado con el kit.
3. La microplaca contiene tiras desprendibles. Pozos no utilizados deben conservarse a 2°C y 8°C en la bolsa de aluminio sellada y utilizarse en el marco o soporte proporcionado.
4. El pipeteo de muestras y reactivos debe realizarse lo antes posible y en la misma secuencia para cada paso.
5. Utilice los embases solamente para los reactivos individuales. Esto se aplica especialmente a los depósitos de sustrato. El uso de un depósito para dispensar una solución de sustrato que habían sido previamente utilizado para la solución de conjugado puede convertirse solución coloreada. No vierta reactivos de nuevo en los viales ya que puede producirse la contaminación de los reactivos.
6. Mezcle el contenido de los pocillos de la microplaca a fondo para asegurar buenos resultados de las pruebas. No reutilice los pocillos.
7. No permita que los pozos se sequen durante el ensayo; añadir los reactivos inmediatamente después de completar los pasos de enjuague.
8. Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (21 a 26°C) antes de comenzar la prueba. La temperatura afectará las lecturas de absorbancia del ensayo. Sin embargo, los valores para las muestras de los pacientes no se verán afectados.
9. Nunca pipetear con la boca y evitar el contacto de los reactivos y las muestras con la piel y las mucosas.
10. No fumar, comer, beber o aplicar cosméticos en áreas en las muestras o reactivos del kit que se manejan.
11. Use guantes de látex desechables al manipular muestras y reactivos. La contaminación microbiana de los reactivos o muestras puede dar resultados falsos.
12. La manipulación debe hacerse de acuerdo con los procedimientos definidos por una directriz de seguridad de riesgo biológico o normativas nacionales pertinentes.
13. No utilizar los reactivos después de la fecha de caducidad, que se muestran en las etiquetas del kit.
14. Los volúmenes indicados tienen que ser realizados de acuerdo con el protocolo. Resultados de las pruebas óptimas solamente se obtienen al utilizar pipetas calibradas y lectores automatizados o semiautomatizados.
15. No mezclar o utilizar componentes de kits con diferentes números de lote. Se recomienda no intercambiar pocillos de distintas placas incluso del mismo lote. Los kits pueden haber sido enviados o almacenado en diferentes condiciones y las características de unión de las placas pueden resultar un poco diferente.
16. Evitar el contacto con la solución de parada. Puede causar irritación de la piel y quemaduras.
17. Productos químicos y reactivos preparados o usados deben ser tratados como desechos peligrosos de acuerdo con la directriz o la regulación nacional de seguridad de riesgo biológico.
18. Para más información consulte las hojas de datos de seguridad de Sheets.Safetly de este producto están disponibles bajo petición directamente desde Demeditec Diagnostics GmbH.

4 REACTIVOS

4.1 Reactivos Provisos

1. **SORB MT Microplaca**, 12x8 tiras (separables), 96 pozos; Pocillos recubiertos con un anticuerpo anti Estradiol.
2. **CAL 0-5 Calibrador** (Calibrador 0-5), 6 viales, 0,3 ml cada uno, listo para su uso; Concentraciones: 0 – 25 – 75 – 225 – 675 – 2000 pg/mL
3. **CONTROL 1-2 Control 1 (bajo) / control 2 (alto)**, 2 viales, 0,3 ml cada uno, listo para su uso; Contienen Estradiol en una matriz buffer- suero. Para los valores de control y rangos consulte QC- Hoja de datos.
4. **ENZ CONJ Enzima - Conjugado**, 1 vial, 11 ml, listo para su uso; 17 β -Estradiol conjugado con peroxidasa de rábano picante;
5. **SUB TMB Solución TMB Sustrato**, 1 vial, 22 ml, listo para su uso; Tetrametilbenzidina (TMB).
6. **STOP SOLN Solución de parada**, 1 vial, 7 ml, listo para su uso; contiene 2N solución ácida. Evite el contacto con la solución de parada. Puede causar irritaciones y quemaduras en la piel.
7. **WASH SOLN 10x Solución de lavado**, 1 vial, 50 ml (10 veces más concentrado); consulte la sección "Preparación de los reactivos".

Nota: Calibrador 0 de dilución de la muestra está disponible contra pedido.

4.2 Material requerido, pero no provisto.

- Un lector calibrado (450 \pm 10 nm)
- Mezclador de microplacas que opere a aproximadamente 600 rpm, opcional.
- Vortex
- Micropipetas calibradas de precisión variables (25 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l).
- Papel absorbente.
- Agua destilada o desionizada
- Cronómetro.

4.3 Condiciones de Almacenamiento

Cuando se almacena a 2 y 8°C los reactivos sin abrir son estables hasta la fecha de caducidad. No utilizar los reactivos después de esta fecha. Reactivos abiertos deben conservarse a 2°C y 8°C. Una vez abiertos los reactivos son estables durante 30 días si se realiza y se almacena correctamente. Los pozos se deben almacenar entre 2 y 8°C. Una vez que la bolsa de aluminio se ha abierto, se debe tener cuidado para cerrarla herméticamente de nuevo.

4.4 Preparación de los reactivos

Deje que los reactivos y el número necesario de pozos alcancen la temperatura ambiente (21 a 26°C) antes de comenzar la prueba.

Solución de Lavado

Añadir agua desionizada al concentrado 10X Solución de Lavado. Diluir 50 ml de solución de lavado concentrado con 450 ml de agua desionizada hasta un volumen final de 500 ml. La solución de lavado diluida es estable durante 12 semanas a temperatura ambiente.

4.5 Eliminación de los Kit

La eliminación del kit debe hacerse de acuerdo con las regulaciones nacionales. Información especial para este producto se presenta en la Hoja de Datos de Seguridad del Material.

4.6 Kits de prueba dañados

En caso de daño severo del kit o componentes de prueba, DEMEDITEC tiene que ser informado por escrito, más tardar una semana después de recibir el kit. Componentes individuales severamente dañadas no se deben usar para una prueba de funcionamiento. Ellos tienen que ser almacenados hasta que se encuentre una solución definitiva. Después de esto, deben desecharse de acuerdo con las disposiciones oficiales.

5 MUESTRAS

Para la determinación de estradiol muestras de suero y plasma (EDTA) pueden ser utilizadas. El procedimiento requiere 25 µL de muestra por pocillo. Las muestras deben analizarse inmediatamente o alícuotas y se almacenan a $\leq -20^{\circ}\text{C}$. Evite los ciclos de congelación y descongelación repetidas. Las muestras que se esperan que contengan concentraciones de estradiol más altas que el calibrador (más alto 2000 pg/ml) se deben diluir con el calibrador cero antes del ensayo. La etapa de dilución adicional tiene que ser tomado en cuenta para el cálculo de los resultados. No utilice muestras hemolizadas, ictericas o lipémicas.

6 PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

6.1 Observaciones Generales

- Todos los reactivos y las muestras se debe permitir que alcancen la temperatura ambiente antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse sin formar espuma o burbujas.
- Una vez que se ha iniciado la prueba, todos los pasos deben ser completados sin interrupción.
- Utilizar nuevas puntas de plástico dispuestas para cada estándar, control o muestra con el fin de evitar la contaminación cruzada.
- La absorbancia es una función del tiempo de incubación y la temperatura. Antes de comenzar el ensayo, se recomienda que todos los reactivos están listos, tapas removidas, todos los pocillos necesarios fijados en el soporte, etc. Esto se asegurará la igualdad en el tiempo transcurrido para cada paso de pipeteo sin interrupciones.
- Como regla general la reacción enzimática es linealmente proporcional al tiempo y la temperatura.
- Respetar los tiempos de incubación como se indica en estas instrucciones de uso.

6.2 Procedimiento del Ensayo

Cada corrida debe incluir una curva estándar.

1. Preparar un número suficiente de pocillos de la microplaca para acomodar los calibradores y muestras en duplicados.
2. Dispensar 25 µl de cada calibrador, muestra y control con puntas nuevas en los pocillos adecuados.
3. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas (> 600 rpm).
4. Añadir 100 µL de conjugado enzimático en cada pocillo.
5. Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente en un agitador de placas (> 600 rpm)
Nota IMPORTANTE: Reacción óptima en este ensayo depende marcadamente de sacudidas de la microplaca!
6. Desechar el contenido de los pocillos y enjuagar los pocillos 4 veces con solución de lavado diluida (300 µl por pocillo). Retire la mayor cantidad de solución de lavado como sea posible al golpear la placa en el papel absorbente.
7. Añadir 200 µl de Sustrato a cada pocillo.
8. Incubar sin agitación durante 30 minutos en la oscuridad.
9. Detenga la reacción añadiendo 50 µl de solución de parada a cada pocillo.
10. Determinar la absorbancia de cada pocillo a 450 nm. Se recomienda leer los pozos dentro de los 15 minutos.

6.3 Cálculo de los resultados

1. Calcular los valores medios de absorbancia para cada conjunto de calibradores, controles y muestras.
2. El uso de papel semi gráfico logarítmico, construir una curva estándar trazando la absorbancia media obtenida de cada estándar frente a su concentración con el valor de la absorbancia en el (Y) eje vertical y la concentración en el eje horizontal (X).
3. Utilizando el valor medio de absorbancia para cada muestra y control, determinar la concentración correspondiente de la curva de calibración.
4. Método Automatizado: Los resultados en el prospecto se han calculado automáticamente utilizando un 4 PL (Logística 4 parámetros) ajuste de la curva. 4 Parameter Logistics es el método de cálculo preferido. Otras funciones de reducción de datos pueden dar resultados ligeramente diferentes.
5. La concentración de las muestras se puede determinar directamente a partir de esta curva de calibradores. Las muestras con concentraciones superiores a la del calibrador más alto tienen que ser diluidas. Para el cálculo de las concentraciones, este factor de dilución tiene que ser tomado en cuenta.

Ejemplo de una típica curva de calibración

Los siguientes datos son sólo para ilustración y no deben utilizarse para calcular los resultados de una corrida real.

Calibrador	Densidad Óptica (450nm)
Calibrador 0 (0 pg/mL)	2.738
Calibrador 1 (25pg/mL)	2.439
Calibrador 2 (75pg/mL)	1.999
Calibrador 3 (225pg/mL)	1.320
Calibrador 4 (675pg/mL)	0.711
Calibrador 5 (2000 pg/mL)	0.346

7 VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales.

En un estudio realizado con adultos sanos de apariencia normal, utilizando el Demeditec Estradiol ELISA se observaron los siguientes valores:

Pacientes	Edad	5%-95% Percentil
Masculinos	< 50 años	n.d. – 36.2 pg/ml
	> 50 años	n.d. – 51.1 pg/ml
Femeninos	< 50 años	n.d. – 111.4 pg/ml
	> 50 años	n.d. – 37.9 pg/ml

n.d.= no detectable

Los valores provistos aquí, fueron determinados sin considerar las fases del ciclo menstrual. Sólo los resultados de este ensayo no deben ser la única razón para tratamiento. Los resultados deben correlacionarse con observaciones clínicas y pruebas de diagnóstico.

8 CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

8.1 Sensibilidad Analítica

El nivel detectable analítica más baja de estradiol que se puede distinguir del calibrador cero es 6,2 pg/ml en el límite de confianza 2SD.

8.2 Especificidad (Reacción Cruzada)

Los siguientes analitos han sido evaluados para determinar la reactividad cruzada. El porcentaje indica la reactividad cruzada a 50% de desplazamiento en comparación con el estradiol.

Esteroides	% Reacción Cruzada
Androstenediona	< 0.1
17-Hidroxiprogesterona	< 0.1
Corticosterona	< 0.1
Estriol	0.4
Estrona	4.2
Pregnenolona	< 0.1
E2-3-Glucuronida	3.8
E2-3-Sulfato	3.6
E2-17-Glucuronida	< 0.1
Progesterona	< 0.1
Testosterona	< 0.1
Fulvestrant	9.5

8.3 Rango de Ensayo Dinámico

El rango de ensayo se encuentra entre: 25 – 2000 pg/mL.

8.4 Reproducibilidad

8.4.1 Intra-Ensayo

La variación intra-ensayo se determinó mediante 20 mediciones repetidas de tres muestras de suero dentro de una corrida. La variabilidad intra-ensayo se muestra a continuación:

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media (pg/mL)	83.8	269.9	794.8
SD	5.3	8.5	29.5
CV (%)	6.4	3.1	3.7
n =	20	20	20

8.4.2 Inter-Ensayo

La variación inter-ensayo (entre corrida) fue determinada por mediciones duplicadas de tres muestras de suero en 10 pruebas diferentes.

	Suero 1	Suero 2	Suero 3
Media (pg/mL)	85.2	251.3	727.8
SD	4.7	11.7	32.6
CV (%)	5.5	4.7	4.5
n =	10	10	10

8.5 Recuperación

Utilizando dos soluciones enriquecidas como calibrador matriz de 100 ng/mL y 10 ng/ml. Tres sueros (1-3) se enriquecieron con 10 y 25 µl de la solución de 10 ng / mL y con 6 µl de la solución de 100 ng/mL dejando las matrices de suero relativamente intacta. Todas las muestras se midieron por el procedimiento DEMEDITEC Estradiol ELISA.

Muestra	Enriquecimiento (pg/mL)	Medida (pg/mL)	Esperado (pg/mL)	Recuperación (%)
1	-	27.8	-	-
	100	141.3	127.8	111%
	250	315.0	277.8	113%
	600	685.0	627.8	109%
2	-	10.3	-	-
	100	119.3	110.3	108%
	250	267.4	260.3	103%
	600	710.3	610.3	116%
3	-	4.2	-	-
	100	98.7	104.2	95%
	250	267.3	254.2	105%
	600	668.1	604.2	111%

8.6 Linealidad

Tres muestras de suero se analizaron sin diluir y diluidas con el calibrador cero.

Sueros	Dilución	Medida (pg/mL)	Esperado (pg/mL)	Linealidad(%)
1	-	715.9	./.	./.
	1 in 2	321.3	358.0	90%
	1 in 4	164.4	179.0	92%
	1 in 8	88.9	89.5	99%
2	-	1012.7	./.	./.
	1 in 2	553.3	506.4	109%
	1 in 4	306.0	253.2	121%
	1 in 8	146.8	126.6	116%
3	-	1099.2	./.	./.
	1 in 2	583.4	549.6	106%
	1 in 4	316.1	274.8	115%
	1 in 8	165.0	137.4	120%

9 LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Se obtendrán resultados fiables y reproducibles cuando el procedimiento de ensayo se realice con una comprensión completa del prospecto y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio. Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación de esta prueba podrían influir en los resultados.

Interferencias

Cualquier medicamento (crema, aceite, pastillas, etc.) que contiene estradiol, por supuesto, va a influir significativamente en la medición de este analito.

El Estradiol ELISA no se debe utilizar con pacientes que esten siendo tratados con el fármaco fulvestrant (Faslodex®) que puede producir una reacción cruzada con el Estradiol ELISA dando lugar a resultados falsamente elevados.

10 ASPECTOS LEGALES

10.1 Confiabilidad de los resultados

La prueba debe realizarse exactamente según las instrucciones del fabricante. Además, el usuario debe seguir estrictamente las reglas de GLP (Good Laboratory Practice) u otras normas y / o leyes nacionales aplicables. Esto es especialmente relevante para el uso de reactivos de control. Es importante incluir siempre, dentro del procedimiento de prueba, un número suficiente de controles para validar la exactitud y precisión de la prueba.

Los resultados de las pruebas son válidas sólo si todos los controles están dentro de los rangos especificados y si todos los demás parámetros de ensayo son también dentro de las especificaciones de ensayo dadas. En caso de cualquier duda o inquietud, por favor póngase en contacto con DEMEDITEC

10.2 Tratamiento

Los tratamientos nunca deben basarse en los resultados de laboratorio por sí solo, incluso si todos los resultados de las pruebas están de acuerdo con los artículos según lo indicado en el punto 10.1. Cualquier resultado de laboratorio es sólo una parte del cuadro clínico total de un paciente.

Sólo en los casos en que los resultados de laboratorio están en acuerdo con el cuadro clínico general del paciente debe ser derivado consecuencias terapéuticas.

El resultado de la prueba en sí no debe ser el único factor determinante para derivar tratamientos.

10.3 Responsabilidad









Cualquier modificación del kit y / o canje o la mezcla de los componentes de diferentes lotes de un kit de prueba a otro podría afectar negativamente a los resultados previstos y la validez de la prueba general. Dicha modificación y / o intercambios invalidan cualquier reclamación de reemplazo.

Los reclamos presentados debido a la mala interpretación de clientes de los resultados de laboratorio sometidos a punto 10.2. también son válidos. De todos modos, en el caso de cualquier reclamación, la responsabilidad del fabricante es que no exceda el valor del kit de prueba. Cualquier daño causado al equipo de prueba durante el transporte no está sujeto a la responsabilidad del fabricante.

11 REFERENCIAS

1. 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 - 11 (1980).
2. 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., pp. 331-85. *Raven Press*, New York (1988).
3. Hall, P.F., Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. In: The Physiology of Reproduction, Ed.: Knobil, E., and Neill, J. et al., pp 975-98. *Raven Press*, New York (1988).
4. Siiteri, P.K. Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. and Kuhn, R.W., The serum transport of steroid hormones, *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:457 - 510 (1982).
5. 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: 443-47 (1981).
6. Baird, 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. pp. 125-33, *Academic Press*, New York (1976).
7. McNastty, 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).
8. Abraham, G.E., Odell, W.D., Swerdloff, R.S. and Hopper, K., Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-18 (1972).
9. 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. Metab.* 49:507-12 (1979).
10. Simpson, E.R. and McDonald, P.C., Endocrinology of Pregnancy. In: Textbook of Endocrinology, Ed.: Williams, R.H. pp412-22, *Saunders Company*, Philadelphia (1981).
11. Jenner, M.R., Kelch, R.P., et al., Hormonal Changes in prepubertal children, pubertal females and in precocious puberty, premature thelarche, hypogonadism and in a child with feminising tumour, *J. Clin. Endocrinol.* 34: 521 (1982).
12. Goldstein, D. et al., Correlation between oestradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency, *Fertil. Steril.* 37: 348-54 (1982).
13. Kirschner, M.A., Therole of hormones in the etiology of human breast cancer, *Cancer* 39:2716 26 (1977).
14. Odell, W.D. and Swerdloff, R.D., Abnormalities of gonadal function in men, *Clin. Endocr.* 8:149-80 (1978).
15. McDonald, P.C., Madden, J.C., Brenner, P.F., Wilson, J.D. and Siiteri, P.K. Origin of oestrogen in normal men and women with testicular feminisation, *J.Clin. Endocrinol. Metabol.* 49:905 (1979).
16. Peckham, M.J: and McElwain, T.J., Testicular tumours, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 4:665-692 (1975).
17. Taubert, H.D. and Dericks-Tan, J.S.E., Induction of ovulation by clomiphene citrate in combination with high doses of oestrogens or nasal application of LH-RH. In: Ovulation in the Human. Eds.: Crosignandi, P.G. and Mishell, D.R., pp.265-73, *Academic Press*, New York (1976).
18. 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 fertilisation using the natural menstrual cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin, *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1:24-28 (1985).
19. Wramsby, H., Sundstorm, 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 oestradiol and progesterone as sole index. *Human Reproduction* 2: 325-28 (1987).
20. Ratcliff, 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).
21. Tietz, N.W., *Textbook of Clinical Chemistry*. Saunders, 1986.

SYMBOLS USED WITH DEMEDITEC ELISA

Symbol	English	Deutsch	Français	Espanol	Italiano
	European Conformity	CE-Konformitätskennzeichnung	Conforme aux normes européennes	Conformidad europea	Conformità europea
	Consult instructions for use	Gebrauchsanweisung beachten	Consulter les instructions d'utilisation	Consulte las Instrucciones	Consultare le istruzioni per l'uso
	In vitro diagnostic device	In-vitro-Diagnostikum	Usage Diagnostic in vitro	Diagnóstico in vitro	Per uso Diagnostica in vitro
	For research use only	Nur für Forschungszwecke	Seulement dans le cadre de recherches	Sólo para uso en investigación	Solo a scopo di ricerca
	Catalogue number	Katalog-Nr.	Référence	Número de catálogo	No. di Cat.
	Lot. No. / Batch code	Chargen-Nr.	No. de lot	Número de lote	Lotto no
	Contains sufficient for <n> tests/	Ausreichend für "n" Ansätze	Contenu suffisant pour "n" tests	Contenido suficiente para <n> ensayos	Contenuto sufficiente per "n" saggi
	Note warnings and precautions	Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen beachten	Avertissements et mesures de précaution font attention	Tiene en cuenta advertencias y precauciones	Annoti avvisi e le precauzioni
	Storage Temperature	Lagerungstemperatur	Temperature de conservation	Temperatura de conservacion	Temperatura di conservazione
	Expiration Date	Mindesthaltbarkeitsdatum	Date limite d'utilisation	Fecha de caducidad	Data di scadenza
	Legal Manufacturer	Hersteller	Fabricant	Fabricante	Fabbricante
<i>Distributed by</i>	Distributor	Vertreiber	Distributeur	Distribuidor	Distributore