



ELISA

Mikrotitrační metoda

17- β -Estradiol

REF: K00194

Pro in vitro diagnostické použití

Produktový leták

ELISA pro **kvantitativní** stanovení 17- β -Estradiolu v lidském séru nebo plazmě



Mikrotitrační metoda – 96 jamková

(12 x 8 jamkových antigenem potažených proužků)

Jednotlivě zlomitelné

OBECNÉ INFORMACE

○ **Vlnová délka**

Měřicí filtr: 450 nm

Referenční filtr: 620-630 nm

○ **Doba inkubace**

150 minut (120 min při 37°C/30 min při pokojové teplotě)

○ **Enzymový konjugát**

HRP (křenová peroxidáza)

○ **Substrát**

TMB (3,3',5,5'- Tetrametyl-benzidin)

○ **Vzorek**

Sérum nebo plazma

○ **Kalibrační rozsah**

0 – 2000 pg/mL

○ **Citlivost**

8.68 pg/mL

○ **Životnost a stabilita součástí kitu**

Kit: 15 měsíců od data výroby

Součásti kitu: viz datum expirace na označení

1. REAGENCIE, MATERIÁL A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

1.1 Reagencie a materiál dodávaný v kitu

Kalibrátor (C_A , C_B , C_C , C_D , C_E , C_F): C_A 1.0 mL/vialka, C_B – C_F 0.5 mL/vialka

Kalibrátory 17- β -Estradiolu mají následující koncentrace:

	C_A	C_B	C_C	C_D	C_E	C_F
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

Kontrola 17- β -Estradiolu: 0.5 mL, koncentrace kontroly je závislá na šarži, jak je uvedeno na označení vialky a je uvedena na záznamu kontroly kvality.

Enzymový konjugát: 22 mL k přímému použití. Konjugát 17- β -Estradiol-HRP.

10x konc. promývací roztok: 50 mL, fosfátový pufr 0.2 M.

Mikrotitrační destička: IgG protilátka proti 17- β -Estradiolu absorbovaná na destičce.

Roztok substrátu: 1x 15 mL H_2O_2 -TMB 0.26g/L (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)

Zastavovací roztok: 1x 15 mL kyseliny sírové 0.15 M (zabraňte jakémukoli styku s pokožkou)

1.2 Potřebné reagencie, které nejsou dodávány s kitem

- Destilovaná voda

1.3 Doplnkový materiál a přístrojové vybavení

- Automatický dávkovač
- Reader mikrotitračních destiček (450 nm, 620-630 nm).

1.4 Poznámky

Všechny reagencie skladujte při 2 – 8 °C ve tmě. Sáček s mikrotitrační destičkou otevírejte, pouze když je ohřátá na pokojovou teplotu a okamžitě po použití uzavřete. Po otevření je stabilní do data expirace.

2. KLINICKÝ VÝZNAM

17- β -Estradiol je sexuální hormon představující hlavní estrogen u lidí. Estradiol má nejen kritický vliv na reprodukční a sexuální funkce, ale ovlivňuje také jiné orgány včetně struktury kostí. V průběhu reprodukčních let je většina estradiolu u žen produkována vaječníky, menší množství estradiolu jsou produkována také kůrou nadledvin. U mužů produkují estradiol varlata. V plazmě je estradiol převážně vázán na sexuální hormony vázající globulin, také na albumin, a pouze zlomek je volný a biologicky aktivní. Měření estradiolu v séru odráží u žen primárně aktivitu vaječnicků. V průběhu těhotenství hladiny estrogenů, včetně estradiolu, plynule stoupají směrem k termínu porodu. Estradiol se zvyšuje kvůli jeho produkci placentou. U dospělých žen před menopauzou je produkce estradiolu vaječníky stimulována interakcí luteinizačního hormonu (LH) a folikuly stimulujícího hormonu (FSH) v průběhu menstruačního cyklu. U dospělých žen jsou hladiny estradiolu měřeny pro vyhodnocení plodnosti a nepravidelností menstruačního cyklu, nebo pro monitorování funkce folikul vaječnicků v průběhu vyvolání ovulace. Estradiol působí u ženy jako růstový hormon pro tkáň reprodukčních orgánů. Vývoj sekundárních pohlavních znaků u žen je také řízen estradiolem. Estradiol je také zapojen v mužské plodnosti. Estradiol reguluje údržbu kostí. Ženy po menopauze zažívají zrychlenou ztrátu kostní hmoty kvůli relativní deficienci estrogenu. Estradiol ovlivňuje produkci mnoha proteinů včetně lipoproteinů, vazebních proteinů, proteinů odpovědných za srážlivost krve. Zjistilo se také, že estrogény mají neuroprotektivní účinky.

Estrogen se považuje za onkogen, protože podporuje jisté rakoviny, hlavně rakovinu prsu a rakovinu dělohy. Dále existuje mnoho benigních gynekologických stavů závislých na estrogenu jako endometrióza, leiomyomy dělohy, a děložní krvácení.

3. PRINCIP

17- β -Estradiol (antigen) ve vzorku soutěží se 17- β -Estradiolem značeným křenovou peroxidázou (enzymem značený antigen) o vazbu na omezené množství vazebných míst protilátek proti 17- β -Estradiolu potažených na destičkách (pevná fáze). Po inkubaci se vykonává separace navázaných a volných molekul jednoduchým promytím pevné fáze. Dále jsou přidány substrát (H_2O_2) a TMB-substrát (TMB). Po uplynutí příslušné doby pro maximální vývoj barvy je enzymatická reakce zastavena a určí se absorbance. Koncentrace 17- β -Estradiolu ve vzorku se vypočte na základě sady kalibrátorů. Intenzita barvy je nepřímo úměrná koncentraci 17- β -Estradiol ve vzorku.

4. VAROVÁNÍ

- Tento kit je určen pouze pro profesionální in vitro použití.
- Při práci s dodanými reagensy používejte vhodné osobní ochranné vybavení.
- Některé reagensy obsahují malé množství Proclin300[®] jako konzervantu. Zabraňte styku s pokožkou a sliznicemi.
- Substrát TMB obsahuje dráždivou látku, která může být nebezpečná po vdechnutí, požití nebo po absorpci pokožkou. Pro předcházení poranění zabraňte vdechnutí, požití nebo styku s pokožkou a očima.
- Zastavovací roztok pozůstává z roztoku zředěné kyseliny sírové. Kyselina sírová je jedovatá a korozivní a může být toxická po požití. Pro předcházení chemickým poleptáním zabraňte styku s pokožkou a očima.
- Vyhněte se vystavení substrátu TMB/ H_2O_2 přímému světlu, kovům a oxidantům.
- Tato metoda umožňuje stanovení 17- β -Estradiolu od 20 pg/mL do 2000 pg/mL.
- Klinický význam stanovení koncentrace 17- β -Estradiolu může být zneplatněn, pokud byl pacient léčen kortizonem nebo přírodními nebo syntetickými steroidy.

5. BEZPEČNOSTNÍ OPATŘENÍ

- Dodržujte prosím přesně postupnost pipetovacích kroků uvedených v tomto protokolu.
- Všechny reagensy musí být skladovány v chladu při teplotě 2 - 8 °C v jejich původních nádobách. Jakékoli výjimky jsou jasně uvedeny.
- Před použitím nechte všechny součásti kitu a vzorky dosáhnout pokojovou teplotu (22-28 °C) a dobře je promíchejte.
- Nezaměňujte součásti kitu z různých šarží. Datum expirace vytisknutý na označení krabice a vialek je nutné dodržovat. Nepoužívejte žádné součásti kitu po datu expirace.
- Pokud používáte automatizované vybavení je vaší zodpovědností ujistit se, že kit byl vhodně otestován.
- Neúplné nebo nepřesné odstranění kapaliny z jamek může ovlivnit přesnost analýzy a/nebo zvýšit pozadí. Pro zlepšení činnosti kitu s automatizovanými systémy se doporučuje zvýšit počet promytí.
- Je důležité, aby byla ve všech jamkách udržena konstantní doba reakce kvůli opakovatelnosti výsledků. Pipetování vzorků by nemělo trvat déle než 10 minut, aby se zamezilo driftu analýzy. Pokud je potřebných víc jako 10 minut, dodržujte stejné pořadí dávkování. Pokud se používá více než jedna destička, doporučuje se zopakovat kalibrační křivku odezvy v každé destičce.
- Přidání roztoku substrátu spouští kinetickou reakci, která je ukončena přidáním zastavovacího roztoku. Proto musí být TMB substrát a zastavovací roztok přidávány ve stejné sekvenci, aby se zamezilo jakýmkoli časovým odchylkám v průběhu reakce.
- Dodržujte směrnice pro vykonávání kontroly kvality v zdravotnických laboratořích měřením kontrol nebo spoolovaných (spojených) sér.
- Pro rozpouštění a dávkování reagensů je potřebná maximální přesnost.
- V analýze by se neměly používat mikrobiologicky kontaminované vzorky. Stejně by se neměly používat vysoce lipemické nebo hemolytické vzorky.
- Readery destiček měří vertikálně. Nedotýkejte se spodků jamek.

6. POSTUP TESTU

6.1 Příprava kalibrátorů

Kalibrátory mají následující koncentrace 17-β-Estradiolu:

	C _A	C _B	C _C	C _D	C _E	C _F
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

Stabilita: do data expirace vytisknutého na kitu.

Po otevření jsou stabilní po dobu šesti měsíců při +4 °C.

6.2 Příprava konjugátu

Konjugát je určen k přímému použití. Jemně promíchejte po dobu 5 minut pomocí rotačního mixéru.

Po otevření je stabilní po dobu šesti měsíců při 2-8 °C.

6.3 Příprava promývacího roztoku

Obsah vialky „10x konc. promývacího roztoku“ zředte před použitím destilovanou vodou na konečný objem 500 mL. Pro menší objemy dodržujte poměr ředění 1:10. Zředěný promývací roztok je stabilní 30 dní při 2-8 °C. V koncentrovaném promývacím roztoku je možné pozorovat přítomnost krystalů. V tomto případě míchejte při pokojové teplotě do rozpuštění krystalů. Pro vyšší přesnost zředte celou nádobku koncentrovaného promývacího roztoku do 500 mL. Dbejte o to, abyste přenesli také krystaly vypláchnutím láhve, potom míchejte do úplného rozpuštění krystalů.

6.4 Příprava vzorku

Stanovení 17-β-Estradiolu je možné vykonat v lidském séru nebo plazmě. Pokud stanovení neproběhne v den odběru vzorku, skladujte vzorky při -20 °C. Vyhněte se opakovanému zamrazování a rozmrazování vzorků.

Před použitím jemně promíchejte po dobu 5 minut pomocí rotačního mixéru.

6.5 Postup

- Všechny reagenty nechte dosáhnout pokojové teploty (22 – 28 °C) po dobu alespoň 30 minut. Po ukončení analýzy okamžitě uskladněte při 2-8 °C; vyhněte se delšímu vystavení pokojové teplotě.
- Nepoužité potažené mikrotitrační proužky je třeba bezpečně uzavřít ve vřecku s desikantem a uskladnit při 2-8 °C.
- Pro zabránění potencionální mikrobiální nebo chemické kontaminace se nepoužité reagenty nesmí přenášet zpátky do původních nádob.
- Protože je nezbytné vykonávat stanovení v duplikátech kvůli zvýšení přesnosti výsledků testu, připravte si dvě jamky pro každý z pěti bodů kalibrační křivky (C_A – C_F), dvě pro každý vzorek, dvě pro každou kontrolu, a jednu pro blank.

Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Vzorek/Kontrola	---	25 µL	---
Kalibrátor C _A – C _F	25 µL	---	---
Konjugát	200 µL	200 µL	---

Inkubujte při +37 °C po dobu 2 hodin.

Odstraňte obsah každé jamky; jamky. Promyjte třikrát 300 µL zředěného promývacího roztoku.

Důležitá poznámka: během každého promývacího kroku destičkou 5 sekund jemně zatřeste a odstraňte nadbytečný roztok oklepáním obrácené destičky o absorpční papírový ubrousek.

Automatická promývačka: v případě že používáte automatickou promývačku, promyjte jamky alespoň 5 krát.

Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Roztok substrátu	100 µL	100 µL	100 µL

Inkubujte při pokojové teplotě (22 – 28 °C) po dobu 30 minut ve tmě.

Pipetujte:

	Kalibrátor	Vzorek/Kontrola	Blank
Zastavovací roztok	100 µL	100 µL	100 µL

Destičkou jemně třeste. Změřte absorpenci při 450 nm oproti referenční vlnové délce 620 – 630 nm nebo oproti blanku v průběhu 5 minut.

7. KONTROLA KVALITY

Každá laboratoř musí měřit kontroly v rozsahu normální, vysoké a nízké hladiny estradiolu pro sledování činnosti metody. S těmito kontroly je třeba zacházet jako s neznámými a v každém provedeném testovacím běhu pro ně stanovit hodnoty. Je potřebné udržovat tabulky kontroly kvality kvůli sledování činnosti dodávaných reagensů. Pro zjištění trendů je potřebné použít vhodné statistické metody. Jednotlivá laboratoř si musí určit přijatelné limity činnosti metody. Další parametry, které je potřebné sledovat, jsou 80, 50 a 20 % průsečíky kalibrační křivky pro opakovatelnost od běhu k běhu. Dále musí být maximální absorpance konsistentní s dřívějšími měřeními. Značná odchylka od určené činnosti může značit nepostřehnutou změnu v experimentálních podmínkách nebo degradaci reagensů kitu. Pro určení důvodu odchylek je potřebné použít čerstvé reagensie.

8. VÝSLEDKY

8.1 Průměrná absorpance

Vypočtete průměrnou absorpenci (E_m) pro každý bod kalibrační křivky (C_A - C_F) a pro každý vzorek.

8.2 Kalibrační křivka

Vyneste průměrnou hodnotu absorpance (E_m) kalibrátorů (C_A - C_F) oproti jejich koncentraci. Přeložte nejlépe se překrývající křivku přes vnesené body. (r : 4 parametrická logistická)

8.3 Výpočet výsledků

Interpolujte hodnoty vzorků z kalibrační křivky, abyste získali příslušné hodnoty koncentrace uvedené v pg/mL.

9. REFERENČNÍ HODNOTY

Hodnoty 17-β-Estradiolu v séru nebo plazmě jsou shrnuty v následující tabulce:

ŽENY	Folikulární fáze:	30 – 100 pg/mL
	Pík ovulace	130 – 350 pg/mL
	luteinizační fáze	50 – 180 pg/mL
	menopauza	< 60 pg/mL
DĚTI		< 40 pg/mL
MUŽI		< 60 pg/mL

Věnujte prosím pozornost faktu, že stanovení rozsahu očekávaných hodnot pro „normální“ populaci v dané metodě je závislé na mnoha faktorech, jako jsou specifita a citlivost použité metody a druh vyšetřované populace. Proto by měla každá laboratoř posuzovat výrobcem udaný rozsah jako obecný příklad a vytvořit vlastní rozsah očekávaných hodnot založený na populaci vyskytující se v místě její působnosti.

10. CHARAKTERISTIKY ČINNOSTI

10.1 Preciznost

10.1.1 Rozptyl v rámci analýzy

Rozptyl v rámci analýzy byl určen opakovaným měřením (10x) třech různých lidských sér v jedné analýze. Rozptyl v rámci analýzy je $\leq 9\%$.

17-β-Estradiol

10.1.2 Rozptyl mezi analýzami

Rozptyl mezi analýzami byl určen opakovaným měřením třech různých lidských sér v různých šaržích. Rozptyl mezi analýzami je ≤ 10 %.

10.2 Přesnost

Test ředění vykonaný s vysoce koncentrovaným vzorkem 17-β-Estradiolu poskytl průměrnou hodnotu výtěžnosti (±SD) 95.69% ± 7.74% ve vztahu k původním koncentracím.

Výtěžnost 120 – 240 – 480 – 960 pg/mL 17-β-Estradiolu přidaného ke vzorkům poskytl průměrnou hodnotu (±SD) 101.09% ± 5.42% ve vztahu k původním koncentracím

10.3 Citlivost

Nejnižší detekovatelná koncentrace 17-β-Estradiolu vypočtena odečítáním 2x SD od střední hodnoty replikátů, kterou je možné odlišit od nulového kalibrátoru, je 8.68 pg/mL.

10.4 Specificita

Křížové reakce protilátky vypočteny při 50 % podle Abrahama jsou uvedeny v tabulce:

17β Estradiol	100 %
Estron	2 %
Estriol	0.39 %
Testosteron	0.02 %
Fulvestrant	0.09 %
Kortizol	< 7 x 10 ⁻³ %
Progesteron	< 3 x 10 ⁻⁴ %
DHEA-S	< 1 x 10 ⁻⁴ %

Důležitá poznámka: Fulvestrant je chemická sloučenina nalézající se ve složení některých léků používaných k léčbě některých druhů rakoviny u žen po menopauze.; kvůli své chemické podobnosti estradiolem může molekula fulvestrantu interferovat s analýzou a vést k nadhodnocení hladin estradiolu ve vzorku.

V případě pacientů podstupujících léčbu léky s fulvestrantem se doporučuje zkontrolovat klinické údaje získané s tímto kitem s jinými údaji kvantifikace estradiolu kvůli ověření interference fulvestrantu.

10.5 Korelace s komerčním kitem

DIALAB 17-β-Estradiol ELISA byla porovnána s jinou komerčně dostupnou metodou 17-β-Estradiolu. Bylo změřeno 16 vzorků séra v obou testovaných systémech. Byla vypočtena lineární regresní křivka:

DIALAB 17-β-Estradiol = 1.09 * (17-β-Estradiol Ref) - 12.96

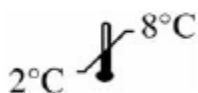
R² = 0.996

11. NAKLÁDÁNÍ S ODPADEM

Reagencie musí být likvidovány podle místních nařízení.

12. LITERATURA

1. Joshi, U.M., et al Steroids 34(1)35(1979)
2. D.Exley and R. Abuknesha Febs Letters 91,(2) 162 (1978)
3. Ismail, A.A.Niswender, G.D. and Midgley, A.R. J. Clin:Endocrin. Metab: 34,177-184 (1972)
4. Rajkowski,K.M.,Cittanova N.Desfosses, B. and Jayle,M.F. Steroids 29 - 5 (1977)
5. Wisdom G.B. Clin. Chem. 22/8, 1243-1255 (1976)
6. Dora Sadem, Eziona Sela and Charles S. Hexter. et al J. of Immunological Methods 28 (1979) 125-131



17- β -Estradiol

ELISA

DIALAB



DIALAB Produktion und Vertrieb von chemisch – technischen Produkten und Laborinstrumenten Gesellschaft m.b.H.
A – 2351 Wiener Neudorf, Austria, IZ-NÖ Süd, Hondastrasse, Objekt M55
Phone: ++43 (0) 2236 660910-0, Fax: ++43 (0) 2236 660910-30, e-mail: office@dialab.at