

17 beta-Estradiol

CE

Only for in-vitro diagnostic use

Instructions for use / Notice d'utilisation / Instrucciones de uso

English	2
Français	9
Español	16
Literature / Bibliographie / Bibliografía.....	26
Packaging materials / Matériels d'emballage / Materiales de embalaje	26
Symbols Key / Explication des symboles / Símbolos	27
Summary of Test Procedure / Résumé de la procédure de test / Resumen de la técnica	28

REF

DNOV003 (96 Determinations)

ENGLISH

1. INTRODUCTION

17 beta-Estradiol (also known as 17 β -Estradiol, oestradiol or E2) is one of the three main estrogens produced in the human body. The other two are Estrone (E1) and Estriol (E3) which are mainly produced in post-menopausal women and during pregnancy respectively. Estradiol is the predominant estrogen synthesised in pre-menopausal women and has a key role in the regulation of fertility in women.

Estradiol is synthesised in the adrenal glands, the ovaries (women) and tests (men). It is produced by the conversion of testosterone to estradiol by the action of the enzyme aromatase. The enzyme aromatase is also responsible for production of estrone by the conversion of androstenedione¹.

Estrogens regulate the development of secondary sex characteristics; estradiol is also involved in other physiological functions in different organs and systems such as skin, blood vessels, bone, muscle, gastrointestinal tract, brain, lung and pancreas² etc. Quantification of estrogens (and androgens) are useful in the assessment and management of different sex-hormone related disorders including hypogonadism, hirsutism, amenorrhea, fertility and ovarian tumours.

Due to the importance of estradiol in the regulation of the menstrual cycle, low levels are associated with disturbance of the cycle and amenorrhea. Measurements can therefore be used to assess ovarian functionality and support diagnosis of ovarian function recovery in women treated with aromatase inhibitors³.

Estradiol levels are known to be low in men where its biological function is not clearly understood. There is some indication that it is involved in several physiological and pathological conditions such as prostate cancer and infertility. Conversely, elevated levels in men, due to high activity of aromatase, inhibits the synthesis of luteinising hormone from the pituitary gland leading to a decrease in testosterone and onset of hypogonadism and gynecomastia.

Estradiol has a key role in bone homeostasis where low levels are associated with loss of bone mass. It has influence on osteoblast and osteoclast activity to support the maintenance of bone homeostasis and is considered a good predictor of bone mass^{1,2,4-6}.

2. INTENDED USE

17 beta-Estradiol is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of 17 β -Estradiol in human serum or plasma.

3. PRINCIPLE OF THE ASSAY

17 beta-Estradiol is a competitive enzyme immunometric assay (ELISA).

Microtiterplates are coated with anti-17 β -Estradiol antibodies (solid-phase). 17 β -Estradiol in the sample competes with added horseradish peroxidase labelled 17 β -Estradiol (enzyme-labelled antigen) for antibody binding. After incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid-phase washing. Then the enzyme HRP in the bound-fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17 β -Estradiol concentration in the sample. Absorption at 450 nm is read using an ELISA Microtiterplate.

17 β -Estradiol concentration in the sample is calculated through a calibration curve.

4. MATERIALS

4.1. Reagents supplied

- **Microtiterplate:** 12 breakapart 8-well snap-off strips coated with anti-17 β -Estradiol antibodies, in resealable aluminium foil.
- **Stop Solution:** 1 bottle containing 15 ml sulphuric acid, 0.15 M (avoid any skin contact).
- **Conjugate:** 1 bottle containing 22 ml of horseradish peroxidase labelled 17 β -Estradiol; contains $\leq$ 0.0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and BSA.
- **TMB Substrate Solution:** 1 bottle containing 15 ml 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26g/L) (avoid any skin contact); contains $\leq$ 0.06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Wash Solution 10x conc.:** 1 bottle containing 50 ml of a 10x concentrated solution of phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4; contains $\leq$ 0.06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Control:** 1 bottle containing 0.5 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label of the bottle; contains $\leq$ 0.06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and BSA.
- **Standards:** 6 bottles, each containing 0.5 ml; contain $\leq$ 0.06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and human serum.

Standard 0:	0 pg/ml
Standard 1:	20 pg/ml
Standard 2:	120 pg/ml
Standard 3:	300 pg/ml
Standard 4:	600 pg/ml
Standard 5:	2000 pg/ml

For hazard and precautionary statements see 16.1.

4.2. Materials supplied

- 1 Cover foil
- 1 Instructions for use (IFU)

4.3. Materials and Equipment needed

- ELISA Microtiterplate reader, equipped for the measurement of absorbance at 450/620-630 nm
- Incubator 37 °C
- Manual or automatic equipment for rinsing Microtiterplates
- Pipettes to deliver volumes between 25 and 1000 µL
- Vortex tube mixer
- Distilled water
- Disposable tubes

5. STABILITY AND STORAGE

The reagents are stable up to the expiry date stated on the label when stored at 2...8 °C in the dark. Once opened, the kit is stable at 2...8°C for 6 months.

6. REAGENT PREPARATION

It is very important to bring all reagents, samples and standards to room temperature (22...28 °C) before starting the test run for at least 30 minutes! At the end of the assay, store immediately the reagents at 2...8 °C; avoid long exposure to room temperature.

6.1. Microtiterplate

The break-apart snap-off strips are coated with anti-17β-Estradiol antibodies. Store at 2...8 °C. Open the bag only when it is at room temperature. Immediately after removal of strips, the remaining strips should be resealed in the aluminium foil along with the desiccant supplied and stored at 2...8 °C; stability until expiry date.

6.2. Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently on a rotating mixer for 5 min.

6.3. Standards

The standard solutions are ready to use.

6.4. TMB Substrate Solution

The bottle contains 15 ml of a tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide system. The reagent is ready to use and has to be stored at 2...8 °C in the dark. The solution should be colourless or could have a slight blue tinge. If the substrate turns into blue, it may have become contaminated and should be thrown away.

6.5. Stop Solution

The bottle contains 15 ml 0.15 M sulphuric acid solution (H314). This ready to use solution has to be stored at 2...8 °C.

6.6. Wash Solution

Dilute the concentrated solution with distilled water to a final volume of 500 ml prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio. The diluted solution is stable for 30 days at 2...8 °C. In the concentrated solution it is possible to observe the presence of crystals, in this case mix at room temperature until complete dissolution of crystals. For greater accuracy dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 ml and take care that all crystals are transferred by washing the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

6.7. Control

The bottle contains 0.5 ml of a lot-specific control solution. The concentration is indicated on the label. The control is ready to use.

7. SPECIMEN COLLECTION AND PREPARATION

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples. Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. Before using, mix gently for 5 minutes with a rotating mixer.

<i>Sample Storage</i>	<i>Duration</i>
2...8 °C	24 hours
Freeze/thaw cycles	1 cycle

8. ASSAY PROCEDURE

8.1. Test Preparation

Please read the Instructions for use carefully **before** performing the assay. Result reliability depends on strict adherence to the Instructions for use as described. Prior to commencing the assay, the distribution and identification plan for all specimens and standards should be carefully established. Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Please allocate at least:

1 well	(e.g. A1)	for the substrate blank
2 wells	(e.g. B1+C1)	for standard 0
2 wells	(e.g. D1+E1)	for standard 1
2 wells	(e.g. F1+G1)	for standard 2
2 wells	(e.g. H1+A2)	for standard 3
2 wells	(e.g. B2+C2)	for standard 4
2 wells	(e.g. D2+E2)	for standard 5
2 wells	(e.g. F2+G2)	for control

It is necessary to determine standards, control and patient samples in duplicate.

Perform all assay steps in the order given and without any appreciable delays between the steps.

A clean, disposable tip should be used for dispensing each standard and each patient sample.

Adjust the incubator to 37 °C.

1. Dispense 25 µl standards, control and samples into their respective wells. Add 200 µl conjugate to each well. Leave well A1 for substrate blank.
2. Cover wells with the foil supplied in the kit.
3. **Incubate for 2 hour at 37 °C.**
4. When incubation has been completed, remove the foil, aspirate the content of the wells and wash each well three times with 300 µl diluted washing solution. Avoid overflows from the reaction wells.

Important note: During each washing step, gently shake the plate for 5 seconds and remove excess solution by tapping the inverted plate on an absorbent paper towel.

Automatic washer: In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.

Note: Washing is critical! Insufficient washing results in poor precision and falsely elevated absorbance values.

5. Dispense 100 µl TMB Substrate Solution into all wells.
6. **Incubate for exactly 30 min at room temperature (22...28 °C) in the dark.**
7. Dispense 100 µl Stop Solution into all wells in the same order and at the same rate as for the TMB Substrate Solution. Shake the microplate gently.
Any blue colour developed during the incubation turns into yellow.
8. Measure the absorbance (E) of the specimen at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against blank within 5 minutes.

8.2. Measurement

Adjust the ELISA Microwell Plate Reader **to zero** using the **substrate blank in well A1**.

If - due to technical reasons - the ELISA reader cannot be adjusted to zero using the substrate blank in well A1, subtract the absorbance value of well A1 from all other absorbance values measured in order to obtain reliable results!

Measure the absorbance of all wells at **450 nm** and record the absorbance values for each standard and patient sample.

Where applicable calculate the **mean absorbance values** of all duplicates.

9. QUALITY CONTROL

Good Laboratory Practice (GLP) requires the use of quality control specimens in each series of assays in order to check the performance of the assay. Controls should be treated as unknown samples, and the results analysed with appropriate statistical methods.

The kit control provided in the kit should be tested as unknown and is intended to assist in assessing the validity of results obtained with each assay plate.

We recommend the users to maintain graphic records of the control values generated with each assay run, including the running means, SDs and %CVs. This information will facilitate the controls trending analysis relating to the performance of current and historical control lots relative to the supplied Quality Control data. The trending will assist in the identification of assays which give control values significantly different from their average range.

When interpreting control data, users should note that this product was designed and developed as a manual product. The range stated on the Certificate of Analysis (CoA) should be appropriate for assays that are performed manually and with strict adherence to the Assay Procedure described above. It is recognised by Quality Control professionals, that as a result of differences in conditions and practices, there will always be variability in the mean values and precision of control measurements between different laboratories⁷.

10. CALCULATION OF RESULTS

A variety of data reduction software packages are available, which may be employed to generate the mean calibration curve and to calculate the mean concentrations of unknown samples and controls. A 4-parameter logistic (4PL) curve fit, **including Standard 0 is recommended.**

Alternatively, a calibration curve may be prepared on semi-log graph paper by plotting mean absorbance on the Y-axis against concentration of analyte on the X-axis. Standard 0 should be included in the calibration curve. Read the mean absorbance value of each unknown sample off the curve.

Conversion of units

To convert results to SI units:

pmol/L = pg/mL x 3.671

11. MEASURING RANGE

The assay measuring range (AMR) is 29.6 – 2000 pg/mL (108.7 – 7342 pmol/L).

Any value that reads below 29.6 pg/mL (108.7 pmol/L) should be reported as “< 29.6 pg/mL (108.7 pmol/L)”. Any value that reads above 2000 pg/mL (7342 pmol/L) should be reported as “> 2000 pg/mL (7342 pmol/L)”.

12. METROLOGY AND TRACEABILITY

The standards of this kit are traceable to the Estradiol standard from the National Metrology Institute of Japan (6004-a).

13. EXPECTED VALUES

The following ranges were determined using the 17 beta-Estradiol and are provided for information only. The 90 % reference interval for apparently healthy adults were calculated by a non-parametric method following guidance from CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

Adults	n	Median (pg/mL)	Reference interval (pg/mL)
Males	120	34.3	<29.6 – 64.2
Females			
Luteal phase	40	71.6	<29.6 – 212.4
Follicular phase	39	46.5	<29.6 – 135.6
Ovulatory phase	41	57.1	<29.6 – 273.5
Post-menopausal	120	32.9	<29.6 – 65.8
Pregnancy			
1 st trimester	40	1120.1	301.2 – >2000
2 nd trimester	39	>2000	1850.3 – >2000
3 rd trimester	40	>2000	>2000

Children	No. of subjects	Median (pg/mL)	Reference interval (pg/mL)
Females			
1 – 10 years	39	56.7	<29.6 – 115.1
10 – 15 years	41	79.8	46.9 – 155.5
15 – 19 years	40	138.3	88.8 – 264.1
Males			
1 – 10 years	40	58.5	<29.6 – 115.7
10 – 15 years	39	39.2	<29.6 – 105.1
15 – 19 years	39	31.7	<29.6 – 91.3

The above ranges should be considered as guidelines only; it is recommended that each laboratory establish its own expected range based upon its own patient population.

14. SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Representative performance data are shown. Results obtained at individual laboratories may vary.

14.1. Detection Capability

The limit of blank (LoB), limit of detection (LoD) and limit of quantitation (LoQ) were determined with guidance from CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” using 6 blanks and 6 low level samples.

Sensitivity	Concentration
Limit of Blank (LoB)	6.8 pg/mL
Limit of Detection (LoD)	14.6 pg/mL
Limit of Quantitation (LoQ)	29.6 pg/mL

14.2. Trueness

Trueness has been demonstrated through a recovery test for the 17 beta-Estradiol with the 17β-Estradiol standard from the National Metrology Institute of Japan (code 6004-a).

14.3. Precision

Precision of the 17 beta-Estradiol was determined by performing a complex precision study.

Repeatability

A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Data from one representative lot is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within run (Repeatability)	
			SD	CV%
1	75	51.7	6.1	11.9%
2	75	134.2	11.3	8.4%
3	75	264.0	25.4	9.6%
4	75	627.7	56.4	9.0%
5	75	838.1	61.5	7.3%
6	75	1346.6	120.2	8.9%

Reproducibility

A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators. Results for the combined data from 2 lots is shown below:

Sample	n	Mean Conc. (pg/mL)	Within Laboratory (Reproducibility)	
			SD	CV%
1	150	52.4	8.2	15.7%
2	150	139.0	21.2	15.3%
3	150	274.7	39.0	14.2%
4	150	633.9	66.0	10.4%
5	150	860.0	95.3	11.1%
6	150	1374.7	159.8	11.6%

14.4. Linearity

Linearity was evaluated based on CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures". For estradiol concentration by 17 beta-Estradiol, the measurement procedure shows linearity for the interval from 16.5 to 2271.3pg/mL (60.57 to 8337.9 pmol/L) within the allowable deviation of linearity (ADL) of $\pm 15\%$.

14.5. Method comparison

The 17 beta-Estradiol was compared against a commercially available quantitative manual assay, following CLSI EP-09C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 106 samples, selected to represent a wide range of estradiol concentrations, was assayed by each method.

Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

n	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
106	0.98 [0.93 to 1.04]	14.5 [8.6 to 18.2]	0.99

14.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross reactant	Concentration tested	Mean % Cross reactivity
Estriol	100 ng/mL	1.0%
Estrone	100 ng/mL	0.9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0.4%
Testosterone	100 ng/mL	0.0%
Cortisol	1000 ng/mL	0.0%
Progesterone	200 ng/mL	0.0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0.0%
17OH Progesterone	100 ng/mL	0.0%
5 α -dihydrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0.0%
Androstenedione	100 ng/mL	0.0%
Androsterone	100 ng/mL	0.0%

Cross reactant	Concentration tested	Mean % Cross reactivity
Cortisone	1000 ng/mL	0.0%
Prednisolone	200 ng/mL	0.0%
Danazol	1000 ng/mL	0.0%
2-Methoxyestradiol	10 ng/mL	0.7%
17 α -Ethinylestradiol	200 ng/mL	0.0%
17 β -Estradiol 17-sulphate	100 ng/mL	0.0%

The following substances do not interfere with a bias of $> \pm 15\%$ in the 17 beta-Estradiol assay when the concentrations are below the stated threshold presented in the following table.

Potentially Interfering Reagent	Threshold Concentration
Bilirubin, conjugated	3.89 mg/dL
Bilirubin, unconjugated	20 mg/dL
Haemoglobin	640 mg/dL
Total Protein	8.3 g/dL
Triglycerides	2000 mg/dL

14.7. Serum-plasma study

The 17 beta-Estradiol matrix comparison study was performed to evaluate the difference across tube types (serum separator tubes (SST), lithium heparin plasma, sodium heparin plasma and K2 EDTA plasma) versus the control samples (red top serum, without additive) following CLSI EP-35 guidelines. A total of 22 samples (18 native, 4 spiked) to cover the range were evaluated. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

Sample type	Slope [95% CI]	Intercept (pg/mL) [95% CI]	Correlation coefficient (r)
SST	1.03 [0.98 to 1.07]	-3.5 [-37.2 to 30.2]	1.00
Lithium Heparin	1.04 [0.97 to 1.12]	-0.8 [-59.0 to 57.4]	0.99
Sodium Heparin	1.10 [1.03 to 1.17]	-8.05 [-62.2 to 46.1]	0.99
EDTA	1.06 [1.01 to 1.11]	-7.6 [-46.3 to 31.1]	0.99

15. LIMITATIONS OF USE

- As in the case of any diagnostic procedure, results must be interpreted in conjunction with the patient's clinical presentation and other information available to the physician.
- Heterophilic antibodies in human serum can react with reagent immunoglobulins, interfering with *in vitro* immunoassays⁸. Patients routinely exposed to animals or to animal serum products can be prone to this interference and anomalous values may be observed.

16. PRECAUTIONS AND WARNINGS

- The test procedure, the information, the precautions and warnings in the instructions for use have to be strictly followed. The use of the testkits with analyzers and similar equipment has to be validated. Any change in design, composition and test procedure as well as for any use in combination with other products not approved by the manufacturer is not authorized; the user himself is responsible for such changes. The manufacturer is not liable for false results and incidents for these reasons. The manufacturer is not liable for any results by visual analysis of the patient samples.
- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
- All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
- Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) as preservative.
- Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through large with amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.

- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.
- The clinical significance of the determination 17β-Estradiol can be invalidated if the patient was treated with cortisone or natural or synthetic steroids.
- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this instructions for use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2...8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22...28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately tested.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.
- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.

16.1. Safety note for reagents containing hazardous substances

Reagents may contain CMIT/MIT (3:1) (refer to 4.1).

Therefore, the following hazard and precautionary statements apply.

	Warning	
	H317	May cause an allergic skin reaction.
	P261	Avoid breathing dust/fumes/gas/mist/vapours/spray.
	P280	Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection.
	P302+P352	IF ON SKIN: Wash with plenty of water.
	P333+P313	If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
	P362+P364	Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

Further information can be found in the safety data sheet.

16.2. Disposal Considerations

Residues of chemicals and preparations are generally considered as hazardous waste. The disposal of this kind of waste is regulated through national and regional laws and regulations. Contact your local authorities or waste management companies which will give advice on how to dispose hazardous waste.

For information about the packaging materials refer to PACKAGING MATERIALS.

17. ORDERING INFORMATION

REF	DNOV003	17 beta-Estradiol	(96 Determinations)
------------	---------	-------------------	---------------------

FRANÇAIS

1. INTRODUCTION

L'estradiol (également appelé 17 β -Estradiol, œstradiol ou E2) est l'un des trois principaux œstrogènes produits par le corps humain. Les deux autres sont l'œstrone (E1) et l'œstriol (E3) qui sont principalement produits respectivement chez les femmes ménopausées et pendant la grossesse. L'estradiol est l'œstrogène prédominant synthétisé chez les femmes pré-ménopausées et joue un rôle clé dans la régulation de la fertilité chez les femmes.

L'estradiol est synthétisé dans les glandes surrénales, les ovaires (femmes) et les testicules (hommes). Il est produit par la conversion de la testostérone en estradiol sous l'action de l'enzyme aromatase. L'enzyme aromatase est également responsable de la production d'œstrone par la conversion de l'androstènedione¹.

Les œstrogènes régulent le développement des caractères sexuels secondaires; l'estradiol est également impliqué dans d'autres fonctions physiologiques dans différents organes et systèmes tels que la peau, les vaisseaux sanguins, les os, les muscles, le tractus gastro-intestinal, le cerveau, les poumons et le pancréas², etc. La quantification des œstrogènes (et des androgènes) est utile pour l'évaluation et la prise en charge de différents troubles liés aux hormones sexuelles, notamment l'hypogonadisme, l'hirsutisme, l'aménorrhée, la fertilité et les tumeurs ovariennes.

En raison de l'importance de l'estradiol dans la régulation du cycle menstruel, de faibles taux sont associés à une perturbation du cycle et à l'aménorrhée. Les mesures peuvent donc être utilisées pour évaluer la fonctionnalité ovarienne et étayer le diagnostic de récupération de la fonction ovarienne chez les femmes traitées par inhibiteurs de l'aromatase³.

On sait que les taux d'estradiol sont faibles chez les hommes et que sa fonction biologique n'est pas clairement comprise. Certains éléments indiquent qu'il est impliqué dans plusieurs conditions physiologiques et pathologiques telles que le cancer de la prostate et l'infertilité. À l'inverse, des taux élevés chez les hommes, dus à une activité élevée de l'aromatase, inhibent la synthèse de l'hormone lutéinisante par l'hypophyse, ce qui entraîne une diminution de la testostérone et l'apparition d'un hypogonadisme et d'une gynécomastie.

L'estradiol joue un rôle clé dans l'homéostasie osseuse, où de faibles taux sont associés à une perte de masse osseuse. Il a une influence sur l'activité des ostéoblastes et des ostéoclastes pour favoriser le maintien de l'homéostasie osseuse et est considéré comme un bon prédicteur de la masse osseuse^{1,2,4-6}.

2. INDICATION D'UTILISATION

Le 17 beta-Estradiol est un dispositif manuel de diagnostic *in vitro* destiné à la détermination quantitative du 17 β -Estradiol dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le 17 beta-Estradiol est un immunodosage enzymatique compétitif (ELISA) dans lequel le 17 β -Estradiol (antigène) de l'échantillon entre en compétition avec le 17 β -Estradiol antigénique conjugué à la peroxydase de raifort (HRP) pour se lier au nombre limité d'anticorps anti-17 β -Estradiol déposés sur la plaque de microtitrage (phase solide). Après l'incubation, la séparation liée/libre est réalisée par un simple lavage en phase solide. Ensuite, l'enzyme HRP dans la fraction liée réagit avec le substrat (H₂O₂) et le substrat TMB; cette réaction provoque l'apparition d'une couleur bleue qui devient jaune lorsque la solution d'arrêt (H₂SO₄) est ajoutée. L'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la concentration de 17 β -Estradiol dans l'échantillon. Un lecteur de plaque de microtitrage ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

La concentration de 17 β -Estradiol dans l'échantillon est calculée par une courbe d'étalonnage.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Plaque de Microtitrage** : 12 bandes détachables enduites d'anti-17 β -Estradiol de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0,15 M (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué** : 1 flacon contenant 22 ml de 17 β -Estradiol marqué à la peroxydase de raifort (HRP) ; contient $\leq 0,0015\%$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1) et BSA.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0,26 g/L) ; (éviter tout contact avec la peau) ; contient $\leq 0,06$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solution de lavage (concentré x10)** : 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois Tampon phosphaté 0,2 M, pH 7.4 ; contient $\leq 0,06$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Contrôle** : 1 flacon contenant 0,5 ml d'un lot spécifique solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette ; contient $\leq 0,06$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1) and BSA.
- **Étalons** : 6 flacons, chacun contenant 0,5 ml ; contiennent $\leq 0,06$ (v/v) CMIT/ MIT (3:1) et du sérum humain

Étalon 0:	0 pg/ml
Étalon 1:	20 pg/ml
Étalon 2:	120 pg/ml
Étalon 3:	300 pg/ml
Étalon 4:	600 pg/ml
Étalon 5:	2000 pg/ml

Pour les mentions de danger et les conseils de prudence voir chapitre 16.1.

4.2. Matériels fournis

- 1 couvercle autocollant
- 1 notice d'utilisation

4.3. Matériels et équipements requis

- Photomètre de Plaques de Microtitrage ELISA, pour mesurer l'absorbance à 450/620-630 nm
- Incubateur 37 °C
- Laveur manuel ou automatique pour le lavage des Plaques de Microtitrage
- Pipettes pour utilisation entre 25 et 1000 µL
- Mélangeur Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2...8 °C à l'obscurité. Une fois ouvert, le kit est stable à 2...8 °C pendant 6 mois.

6. PREPARATION DES REACTIFS

Il est très important que tous les réactifs, échantillons et contrôles soient portés à température ambiante (22...28 °C) pour au moins 30 minutes. À la fin de l'essai conservent les réactifs immédiatement à 2...8 °C; évitez la longue exposition à température ambiante.

6.1. Plaque de Microtitrage

Les barrettes sécables sont revêtues d'anticorps anti 17β-Estradiol et sont prêtes à l'emploi. Conserver entre 2...8 °C. N'ouvrir l'emballage que si la pièce est à température ambiante. Après avoir prélevé les bandes nécessaires, refermer immédiatement les autres dans le sachet d'aluminium avec le déshydratant fourni et les conserver entre 2...8 °C; elles sont stables jusqu'à la date de péremption.

6.2. Conjugué

Solution de conjugué prête à l'emploi. Mettre à agiter délicatement sur un agitateur rotatif pendant au moins 5 minutes.

6.3. Étalons

Les étalons sont prêts à l'emploi.

6.4. Solution de TMB

Le flacon contient 15 ml d'un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tétraméthylbenzidine. Le réactif est prêt à l'emploi et doit être conservé 2...8 °C à l'obscurité. La solution doit être incolore ou avoir une légère teinte bleue. Si le substrat devient bleu, il a pu être contaminé et doit être remplacé.

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (H314). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2...8 °C.

6.6. Solution de lavage

Diluer le contenu de la solution de lavage concentrée avec de l'eau distillée jusqu'à un volume final de 500 ml avant utilisation. Pour les petits volumes respecter la dilution au 10ème. La solution de lavage diluée est stable pendant 30 jours entre 2...8 °C. Il est possible d'observer la présence de cristaux dans la solution de lavage concentrée, dans ce cas, mélanger à température ambiante jusqu'à la dissolution complète des cristaux, pour une meilleure efficacité diluer tout le flacon de solution de lavage jusqu'à 500 ml en surveillant le transfert de cristaux avec le lavage de la bouteille, puis mélanger jusqu'à la dissolution complète des cristaux.

6.7. Contrôle

Le flacon contient 0,5 ml d'une solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette. Le contrôle est prêt à l'emploi.

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

Le test doit être réalisé au moyen d'échantillons de sérum (tubes de prélèvement standard ou tubes contenant un gel de séparation de sérum) ou de plasma (héparine de lithium, héparine sodique ou EDTA de potassium). Conserver l'échantillon à -20 °C si la détermination n'est pas effectuée le jour même du prélèvement de l'échantillon. Éviter les congélations et décongélations à répétition des échantillons. Avant utilisation, mélanger doucement pendant 5 minutes avec un mélangeur rotatif.

<i>Stockage des échantillons</i>	<i>Durée</i>
2...8 °C	24 heures
Cycles de congélation/décongélation	1 cycle

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

Lire attentivement la notice d'utilisation **avant** de réaliser le dosage. La fiabilité des résultats dépend du suivi strict d'utilisation comme décrit. Avant de commencer le dosage, déterminer, sur le formulaire fourni dans le kit, le plan de distribution et d'identification des échantillons et des contrôles. Sélectionner le nombre de bandes ou de puits nécessaires et les placer sur le support.

Réserver au moins:

1 puits	(ex. A1)	Pour le blanc
2 puits	(ex. B1+C1)	Pour l'étalon 0
2 puits	(ex. D1+E1)	Pour l'étalon 1
2 puits	(ex. F1+G1)	Pour l'étalon 2
2 puits	(ex. H1+A2)	Pour l'étalon 3
2 puits	(ex. B2+C2)	Pour l'étalon 4
2 puits	(ex. D2+E2)	Pour l'étalon 5
2 puits	(ex. F2+G2)	Pour le contrôle

Il est recommandé de déterminer les contrôles et les échantillons du patient en doublets.

Réaliser toutes les étapes du dosage dans l'ordre donné et sans interruption entre les étapes.

Un cône de pipette propre et jetable doit être utilisé pour distribuer chaque contrôle et échantillon.

Régler l'incubateur à 37°C.

1. Pipeter 25 µl des étalons, de contrôle et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 200 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 2 heures à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.

Note importante : Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

Équipement automatisé : Si vous utilisez l'équipement automatisé, lavez les puits au moins 5 fois.

Note : L'étape de lavage est très importante ! Un lavage insuffisant peut conduire à une précision faible et des valeurs d'absorbance faussement élevées.

5. Pipeter 100 µl de solution de TMB dans tous les puits.
6. **Incuber pendant exactement 30 min à température ambiante (22...28 °C) à l'obscurité.**
7. Pipeter 100 µl de solution stop dans tous les puits dans le même ordre à la même vitesse que pour la solution de TMB. Secouer doucement la microplaque.
La couleur bleue développée pendant l'incubation vire au jaune.
8. Mesurer l'absorbance des échantillons à 450 nm contre une longueur d'onde de référence de 620-630 nm ou contre le blanc au cours de 5 minutes.

8.2. Mesure

Faire le **zéro** du lecteur ELISA à l'aide du blanc dans le puits A1.

Si - pour des raisons techniques - le lecteur d'ELISA ne peut pas être ajusté à zéro en utilisant le blanc dans le puits A1, soustraire la valeur d'absorbance du puits A1 de toutes les autres valeurs d'absorbance mesurées afin d'obtenir des résultats fiables !

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon.

Calculer **les valeurs moyennes d'absorbance pour tous les doublets, si nécessaires.**

9. CONTROLE QUALITE

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) exigent l'utilisation d'échantillons de contrôle qualité dans chaque série de dosages afin de vérifier la performance du dosage. Les contrôles doivent être traités comme des échantillons inconnus et les résultats doivent être analysés à l'aide de méthodes statistiques appropriées.

Le contrôle fourni dans le kit doit être testé comme un inconnu et est destiné à aider à évaluer la validité des résultats obtenus avec chaque plaque de test.

Nous recommandons aux utilisateurs de conserver les enregistrements graphiques des valeurs de contrôle générés après chaque analyse, y compris les moyennes mobiles, les écarts-types et les coefficients de variation. Ces informations faciliteront l'analyse des tendances des contrôles comparé aux performances des lots de contrôle précédents et actuels par rapport aux données de contrôle qualité fournies. La tendance favorise l'identification des analyses qui donnent des valeurs de contrôle nettement différentes de la plage moyenne.

Lors de l'interprétation des données de contrôle, les utilisateurs doivent noter que ce produit a été conçu et développé comme un produit manuel. La plage définie sur le Certificate of Analysis (CoA) doit être adaptée aux analyses effectuées manuellement et dans le strict respect de la procédure d'analyse décrite précédemment. Tous les professionnels du contrôle de qualité s'accordent à dire que, compte tenu des différences en termes de conditions et de pratiques, il y aura toujours un écart dans les valeurs moyennes et la précision des mesures de contrôle entre des laboratoires différents⁷.

10. CALCUL DES RÉSULTATS

Il existe divers progiciels de réduction des données, ils permettent de générer la courbe d'étalonnage moyenne et de calculer les concentrations moyennes d'échantillons et de contrôles inconnus. Un ajustement de la courbe logistique à 4 paramètres (4PL) **avec étalon 0 est recommandé.**

Il est également possible de préparer une courbe d'étalonnage sur un papier semi-logarithmique en indiquant l'absorbance moyenne sur l'axe Y et la concentration d'analyte sur l'axe X. L'étalon 0 doit être inclus à la courbe d'étalonnage. Lire la valeur d'absorbance moyenne de chaque échantillon inconnu sur la courbe.

Conversion des unités

Pour convertir les résultats en unités SI :

pmol/L = pg/mL x 3,671

11. PLAGE DE MESURE

La plage de mesure du dosage (AMR) est de 29,6 – 2000 pg/mL (108,7 – 7342 pmol/L).

Toute valeur indiquée inférieure à 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L) devra être rapportée comme suit : « < 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L) ».

Toute valeur indiquée supérieure à 2000 pg/mL (7342 pmol/L) devra être rapportée comme suit : « > 2000 pg/mL (7342 pmol/L) ».

12. MÉTROLOGIE ET TRAÇABILITÉ

Les étalons de ce kit sont traçables à l'étalon 17 β -Estradiol de l'Institut national de métrologie du Japon (6004-a).

13. VALEURS ATTENDUES

Les intervalles suivants ont été déterminés à l'aide du dosage 17 beta-Estradiol et sont fournis uniquement à titre d'information. L'intervalle de référence à 90 % pour les adultes apparemment en bonne santé a été calculé à l'aide d'une méthode non paramétrique, conformément à la directive du CLSI C28-A3 « Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory ».

Adultes	n	Médiane (pg/mL)	Intervalle de référence (pg/mL)
Hommes	120	34,3	<29,6 – 64,2
Femmes			
Phase lutéale	40	71,6	<29,6 – 212,4
Phase folliculaire	39	46,5	<29,6 – 135,6
Phase ovulatoire	41	57,1	<29,6 – 273,5
Post-ménopause	120	32,9	<29,6 – 65,8
Grossesse			
1 ^{er} trimestre	40	1120,1	301,2 – >2000
2 ^e trimestre	39	>2000	1850,3 – >2000
3 ^e trimestre	40	>2000	>2000

Enfants	n	Médiane (pg/mL)	Intervalle de référence (pg/mL)
Femmes			
1 à 10 ans	39	56,7	<29,6 – 115,1
10 à 15 ans	41	79,8	46,9 – 155,5
15 à 19 ans	40	138,3	88,8 – 264,1
Hommes			
1 à 10 ans	40	58,5	<29,6 – 115,7
10 à 15 ans	39	39,2	<29,6 – 105,1
15 à 19 ans	39	31,7	<29,6 – 91,3

Les plages ci-dessus doivent être considérées uniquement comme des directives, il est recommandé à chaque laboratoire d'établir ses propres plages attendues sur la base de sa population de patients.

14. PERFORMANCE DU DOSAGE

Les données de performances représentatives s'affichent. Les résultats obtenus dans chaque laboratoire peuvent varier.

14.1. Detection Capability

La limite du blanc (LoB), la limite de détection (LoD) et la limite de quantification (LoQ) ont été déterminées selon les directives du CLSI EP17-A, « Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation » avec 6 blancs et 6 échantillons de bas niveau.

Sensibilité	Concentration
Limite de blanc (LoB)	6,8 pg/mL
Limite de détection (LoD)	14,6 pg/mL
Limite de quantification (LoQ)	29,6 pg/mL

14.2. Exactitude

L'exactitude a été démontrée par un test de récupération pour le dosage 17 beta-Estradiol avec l'étalon 17 β -Estradiol de l'Institut national de métrologie du Japon (code 6004-a).

14.3. Précision

La précision du dosage 17 beta-Estradiol a été déterminée en effectuant une étude de précision complexe.

Répétabilité

Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs. Les données d'un lot représentatif sont présentées ci-dessous :

Échantillon	n	Conc. moyenne (pg/mL)	Intra-série (répétabilité)	
			ET	CV%
1	75	51,7	6,1	11,9%
2	75	134,2	11,3	8,4%
3	75	264,0	25,4	9,6%
4	75	627,7	56,4	9,0%
5	75	838,1	61,5	7,3%
6	75	1346,6	120,2	8,9%

Reproductibilité

Un total de 6 échantillons de sérum a été analysé en 5 répétitions, une fois par jour pendant 5 jours par 3 opérateurs. Les résultats pour les données combinées de 2 lots sont présentés ci-dessous :

Échantillon	n	Conc. moyenne (pg/mL)	Au sein du laboratoire (reproductibilité)	
			ET	CV%
1	150	52,4	8,2	15,7%
2	150	139,0	21,2	15,3%
3	150	274,7	39,0	14,2%
4	150	633,9	66,0	10,4%
5	150	860,0	95,3	11,1%
6	150	1374,7	159,8	11,6%

14.4. Linéarité

La linéarité a été évaluée d'après le CLSI EP-06, « Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures ». Pour la concentration de l'estradiol par 17 beta-Estradiol, la procédure de mesure montre une linéarité pour l'intervalle de 16,5 à 2271,3 pg/mL (60,57 à 8337,9 pmol/L) dans les limites de l'écart de linéarité admissible (ADL) de $\pm 15\%$.

14.5. Comparaison des méthodologies

Le dosage 17 beta-Estradiol a été comparé à un dosage quantitatif automatisé disponible dans le commerce, selon les directives du CLSI EP-09C, « Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples ». Au total, 106 échantillons, sélectionnés pour représenter une large plage de concentrations en estradiol, ont été testés avec chaque méthode. Une analyse de régression linéaire/de Passing-Bablok/Deming

n	Pente [IC à 95 %]	Point d'intersection (pg/mL) [IC à 95 %]	Coefficient de corrélation (r)
106	0,98 [0,93 - 1,04]	14,5 [8,6 - 18,2]	0,99

14.6. Spécificité analytique

La spécificité a été évaluée avec les réactifs croisés suivants.

Réactif croisé	Concentration testée	Réactivité croisée moyenne (%)
Œstriol	100 ng/mL	1,0%
Œstrone	100 ng/mL	0,9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0,4%
Testostérone	100 ng/mL	0,0%
Cortisol	1000 ng/mL	0,0%
Progestérone	200 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0,0%
17OH Progestérone	100 ng/mL	0,0%
5 α -dihydrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0,0%
Androstènedione	100 ng/mL	0,0%
Androstérone	100 ng/mL	0,0%

Réactif croisé	Concentration testée	Réactivité croisée moyenne (%)
Cortisone	1000 ng/mL	0,0%
Prednisolone	200 ng/mL	0,0%
Danazol	1000 ng/mL	0,0%
2-Méthoxyestradiol	10 ng/mL	0,7%
17 α -Éthinylestradiol	200 ng/mL	0,0%
17 β -Estradiol 17-sulfate	100 ng/mL	0,0%

Les substances suivantes n'interfèrent pas avec un biais de $> \pm 15$ % dans le dosage 17 beta-Estradiol lorsque les concentrations sont inférieures au seuil indiqué présenté dans le tableau suivant.

Réactif pouvant interférer	Limite de concentration
Bilirubine, conjuguée	3,89 mg/dL
Bilirubine, non conjuguée	20 mg/dL
Hémoglobine	640 mg/dL
Protéine totale	8,3 g/dL
Triglycérides	2000 mg/dL

14.7. Comparaison sérum-plasma

L'étude comparative de matrices 17 beta-Estradiol a été réalisée pour évaluer la différence entre les types de tubes (tubes séparateurs de sérum [SST], plasma sur héparine de lithium, plasma sur héparine de sodium et plasma sur K2 EDTA) par rapport aux échantillons de contrôle (sérum à capuchon rouge, sans additif) conformément aux directives issues du CLSI EP35. Un total de 22 échantillons (18 natifs, 4 ajoutés). Une analyse de la régression de Passing-Bablok a été réalisée sur les données comparatives :

Type d'échantillon	Pente [IC à 95 %]	Intercept (ng/mL) [IC à 95 %]	Coefficient de corrélation (r)
SST	1,03 [0,98 – 1,07]	-3,5 [-37,2 – 30,2]	1,00
Héparine de lithium	1,04 [0,97 – 1,12]	-0,8 [-59,0 – 57,4]	0,99
Héparine de sodium	1,10 [1,03 – 1,17]	-8,05 [-62,2 – 46,1]	0,99
EDTA	1,06 [1,01 – 1,11]	-7,6 [-46,3 – 31,1]	0,99

15. LIMITES D'UTILISATION

- Comme pour toute procédure diagnostique, les résultats doivent être interprétés eu égard au tableau clinique du patient et aux autres informations à la disposition du médecin.
- Des anticorps hétérophiles du sérum humain peuvent réagir avec les immunoglobulines du réactif et interférer avec les immunodosages *in vitro*⁸. Les patients quotidiennement exposés aux animaux ou aux produits sériques d'origine animale peuvent être sujets à ce type d'interférence; il convient alors d'examiner toute valeur anormale.

16. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- La procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde la notice d'utilisation doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Ce kit est prévu pour une utilisation *in vitro*, par des professionnels uniquement. Il n'est pas destiné à un usage interne ou externe chez l'être humain ou l'animal.
- Porter un équipement de protection individuelle approprié lors de la manipulation des réactifs fournis.
- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) lors de la manipulation des produits sanguins.
- Tous les produits d'origine humaine utilisés dans la préparation des réactifs ont été testés pour les anticorps anti-VIH-1, anti-VIH-2, anti-AgHBs et anti-VHC et ont généré des résultats négatifs. Aucune méthode de test ne peut cependant offrir l'assurance complète de l'absence du VIH, du VHB, du VHC ou d'autres agents infectieux. Par conséquent, les étalons et les contrôles doivent être manipulés comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- Les produits d'origine animale utilisés dans la préparation du kit ont été obtenus à partir d'animaux dont la bonne santé a été certifiée et la protéine bovine a été obtenue dans des pays non touchés par l'ESB. Il convient néanmoins de manipuler ces produits comme s'ils étaient potentiellement infectieux.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités d'azote de sodium (NaN₃) utilisé comme conservateur.

- L'azoture de sodium peut être toxique en cas d'ingestion ou d'absorption par la peau ou les yeux. Il peut en outre réagir avec les tuyauteries en plomb ou en cuivre pour former des azotures métalliques potentiellement explosifs. En cas d'utilisation d'un évier pour éliminer les réactifs, le laver abondamment avec de grandes quantités d'eau pour éviter toute accumulation d'azotures.
- Le substrat TMB contient un agent irritant nocif en cas d'inhalation, d'ingestion ou d'absorption par la peau. Pour prévenir toute blessure, éviter l'inhalation, l'ingestion ou le contact avec la peau et les yeux.
- La solution d'arrêt consiste en une solution d'acide sulfurique dilué. L'acide sulfurique est un poison corrosif qui peut être toxique en cas d'ingestion. Pour prévenir toute brûlure chimique, éviter le contact avec la peau et les yeux.
- Éviter toute exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, à des métaux ou à des agents oxydants. Ne pas congeler la solution.
- La significativité clinique de la détermination du 17β-Estradiol peut être invalidée si le patient a été traité avec de la cortisone ou des stéroïdes naturels ou synthétiques.
- Respecter scrupuleusement l'ordre des étapes de pipetage indiqué dans ce protocole. Les données de performances indiquées dans ce document ont été obtenues en utilisant les réactifs spécifiques énumérés dans ce mode d'emploi.
- Tous les réactifs doivent être conservés au réfrigérateur, à une température comprise entre 2 et 8 °C, dans leur récipient d'origine. Toutes les exceptions sont clairement mentionnées.
- Laisser tous les composants du kit et les échantillons revenir à température ambiante (22...28 °C) et bien mélanger avant utilisation.
- Ne pas mélanger les composants de kits provenant de lots différents. Respecter la date de péremption imprimée sur la boîte et les étiquettes des flacons. N'utiliser aucun composant du kit au-delà de sa date de péremption.
- En cas d'utilisation d'un équipement automatisé, l'utilisateur est tenu de vérifier que le kit a été correctement testé.
- L'élimination partielle ou imprécise du liquide des puits peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer les performances du kit sur les systèmes automatiques, il est recommandé d'augmenter le nombre de lavages.
- Pour obtenir des résultats reproductibles, il est important de conserver le même temps de réaction pour chaque puits. Le pipetage des échantillons ne doit pas dépasser dix minutes pour éviter les écarts de dosage. Si plus de 10 minutes sont nécessaires, suivre le même ordre de distribution. En cas d'utilisation de plusieurs plaques, il est conseillé de répéter la courbe dose-réponse dans chaque plaque.
- L'ajout du substrat TMB déclenche une réaction cinétique qui est interrompue par l'ajout de la solution d'arrêt. Par conséquent, il convient d'ajouter le substrat TMB et la solution d'arrêt dans le même ordre pour éviter tout écart entre les temps de réaction.
- Respecter les directives en matière de contrôle qualité établies dans les laboratoires médicaux par le dosage de contrôles et/ou d'échantillons de sérums regroupés.
- Une précision maximale est requise lors de la reconstitution et de la distribution des réactifs.
- Ne pas utiliser d'échantillons contaminés par des micro-organismes, fortement lipémiques ou hémolysés dans ce dosage.
- Les lecteurs de plaques opèrent à la verticale. Ne pas toucher le fond des puits.

16.1. Note de sécurité pour les réactifs contenant des substances dangereuses

Les réactifs peuvent contenir du CMIT/MIT (3 :1) (voir chapitre 4.1).

Par conséquent, les mentions de danger et les conseils de prudence suivants s'appliquent.

Attention



H317
P261
P280

Peut provoquer une allergie cutanée.
Éviter de respirer les poussières/fumées/gaz/brouillards/vapeurs/aérosols.
Porter des gants de protection/des vêtements de protection/un équipement de protection des yeux/du visage.
P302+P352 EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau.
P333+P313 En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin.
P362+P364 Enlever les vêtements contaminés et les laver avant réutilisation.

De plus amples informations peuvent être trouvées dans la fiche de données de sécurité.

16.2. Elimination des déchets

Les résidus des produits chimiques et des préparations sont considérés en général comme des déchets dangereux. L'élimination de ce type de déchet est réglementée par des lois et réglementations nationales et régionales. Contacter les autorités compétentes ou les sociétés de gestion des déchets pour obtenir des renseignements sur l'élimination des déchets dangereux.

Pour plus d'informations sur les matériaux d'emballage, reportez-vous à la section MATÉRIELS D'EMBALLAGE.

17. INFORMATION POUR LES COMMANDES

REF	DNOV003	17 beta-Estradiol	(96 Dosages)
------------	---------	-------------------	--------------

ESPAÑOL

1. INTRODUCCIÓN

El 17 beta-Estradiol (también conocido como 17β-Estradiol, estradiol o E2) es uno de los tres principales estrógenos producidos en el cuerpo humano. Los otros dos son la estrona (E1) y el estriol (E3), que se producen principalmente en las mujeres posmenopáusicas y durante el embarazo, respectivamente. El estradiol es el estrógeno predominante que se sintetiza en las mujeres premenopáusicas y tiene un papel clave en la regulación de la fertilidad en las mujeres.

El estradiol se sintetiza en las glándulas suprarrenales, los ovarios (mujeres) y los testículos (hombres). Se produce por la conversión de la testosterona en estradiol por la acción de la enzima aromatasa. La enzima aromatasa también es responsable de la producción de estrona mediante la conversión de la androstenediona¹.

Los estrógenos regulan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios; el estradiol también participa en otras funciones fisiológicas en diferentes órganos y sistemas como la piel, los vasos sanguíneos, los huesos, los músculos, el tracto gastrointestinal, el cerebro, los pulmones y el páncreas², etc. La cuantificación de los estrógenos (y andrógenos) es útil en la evaluación y el tratamiento de diferentes trastornos relacionados con las hormonas sexuales, como el hipogonadismo, el hirsutismo, la amenorrea, la fertilidad y los tumores de ovario.

Debido a la importancia del estradiol en la regulación del ciclo menstrual, los niveles bajos se asocian con la alteración del ciclo y la amenorrea. Por lo tanto, las mediciones pueden utilizarse para evaluar la funcionalidad ovárica y apoyar el diagnóstico de la recuperación de la función ovárica en mujeres tratadas con inhibidores de la aromatasa³.

Se sabe que los niveles de estradiol son bajos en los hombres y que su función biológica no se conoce con claridad. Hay indicios de que está implicada en varias condiciones fisiológicas y patológicas, como el cáncer de próstata y la infertilidad. Por el contrario, los niveles elevados en los hombres, debido a la elevada actividad de la aromatasa, inhiben la síntesis de la hormona luteinizante de la hipófisis, lo que provoca una disminución de la testosterona y la aparición de hipogonadismo y ginecomastia.

El estradiol desempeña un papel clave en la homeostasis ósea, donde los niveles bajos se asocian a la pérdida de masa ósea. Influye en la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos para favorecer el mantenimiento de la homeostasis ósea y se considera un buen predictor de la masa ósea^{1,2,4-6}.

2. USO

El 17 beta-Estradiol es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa del 17β-Estradiol en suero o plasma humano.

3. FUNDAMENTO DE LA PRUEBA

El 17 beta-Estradiol es un ensayo enzimático inmunométrico competitivo (ELISA) en el que el 17β-Estradiol (antígeno) de la muestra compete con el 17β-Estradiol antigénico conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) para unirse al número limitado de anticuerpos anti-17β-Estradiol recubiertos en la Placas de Microtitulación (fase sólida).

Tras la incubación, la separación ligada/libre se realiza mediante un simple lavado en fase sólida. A continuación, la enzima HRP de la fracción ligada reacciona con el sustrato (H₂O₂) y el sustrato de TMB, y desarrolla un color azul que cambia a amarillo cuando se añade la solución de detención (H₂SO₄). La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de 17β-Estradiol de la muestra. La absorción a 450 nm se lee con un lector de Placas de Microtitulación de ELISA.

La concentración de 17β-Estradiol de la muestra se calcula mediante una curva de calibración.

4. MATERIALES

4.1. Reactivos suministrados

- **Placa de Microtitulación:** 12 tiras de 8 pozos separables. Los pozos están recubiertas con anti-17β-Estradiol y vienen empacados en una bolsa de papel de aluminio resellable.
- **Solución de parada:** 1 vial con 15 ml de ácido sulfúrico 0,15 M (evite cualquier contacto con la piel).
- **Conjugado:** 1 vial con 22 ml de 17β-Estradiol conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), contiene ≤ 0,0015% (v/v) CMIT/ MIT (3:1) y BSA.
- **Solución de sustrato TMB:** 1 vial con 15 ml de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (H₂O₂-TMB 0,26 g/l) (evite cualquier contacto con la piel); contiene ≤ 0,06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Solución de lavado concentrado x10:** 1 vial con 50 ml de una solución concentrada de buffer de fosfatos 0,2 M; pH 7,4; contiene ≤ 0,06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1).
- **Control:** 1 botella con 0,5 ml de una solución de control específica para cada lote. La concentración se encuentra indicada en la etiqueta de la botella; contiene ≤ 0,06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1) y BSA.
- **Estándares:** 6 botellas, cada una conteniendo 0,5 ml; contienen ≤ 0,06 (v/v) CMIT/ MIT (3:1) y suero humano.

Estándar 0:	0 pg/ml
Estándar 1:	20 pg/ml
Estándar 2:	120 pg/ml
Estándar 3:	300 pg/ml
Estándar 4:	600 pg/ml
Estándar 5:	2000 pg/ml

Para indicaciones de peligro y consejos de prudencia consulte el cap. 16.1.

4.2. Materiales suministrados

- 1 lámina autoadhesiva
- 1 instrucciones de uso

4.3. Materiales y equipos necesarios

- Fotómetro de Placa de Microtitulación con filtros de 450/620-630 nm
- Incubadora 37 °C
- Dispositivo de lavado manual o automático de Placa de Microtitulación
- Micropipetas para uso de (25-1000 µL)
- Mezcladora Vortex
- Agua destilada
- Tubos de plástico desechables

5. ESTABILIDAD Y ALMACENAMIENTO

Los reactivos son estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta cuando se almacenan a 2...8 °C en oscuridad. Una vez abierto el reactivo es estable por 6 meses más si se almacena a 2...8 °C

6. PREPARACION DE LOS REACTIVOS

¡Es muy importante que todos los reactivos, muestras y estándares se encuentren a temperatura ambiente (22...28 °C) durante al menos 30 minutos antes de iniciar la ejecución de la prueba! ¡Al final del ensayo inmediatamente poner todos los reactivos a 2...8 °C para evitar largos periodos a temperatura ambiente !

6.1. Placa de Microtitulación

Las tiras vienen listas para ser usadas y se rompen para separar los pozos. Están recubiertas con anticuerpos anti-17β-Estradiol. Se deben conservar a una temperatura entre 2...8 °C. Abra la bolsa sólo cuando ésta se encuentre a temperatura ambiente. Inmediatamente después de retirar las tiras que va a utilizar, asegúrese de guardar las tiras que no van a ser usados dentro de la bolsa de aluminio resellable, junto con el desecante suministrado y almacénela a una temperatura entre 2...8 °C; las tiras son estables hasta la fecha de caducidad.

6.2. Conjugado

El conjugado viene listo para ser usado. Mézclelo suavemente en el mezclador rotatorio por 5 min.

6.3. Estándares

Los estándares vienen listos para ser usados.

6.4. Solución de sustrato TMB

El frasco contiene 15 ml de un sistema de tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno. El reactivo viene listo para ser usado y debe ser almacenado a 2...8 °C en oscuridad. La solución debe estar incolora o puede tener un ligero tinte azul. Si el sustrato se torna azul, esto indica que puede haberse contaminado y por lo tanto debe desecharse.

6.5. Solución de parada

El frasco contiene 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,15 M (H314). Esta solución viene lista para ser usada y debe ser almacenada a 2...8 °C.

6.6. Solución de lavado

Diluir la solución de lavado concentrada con agua destilada para alcanzar un volumen final de 500 ml antes de emplearla. Para volúmenes más pequeños, asegúrese de respetar una relación de 1:10. La solución de lavado diluida es estable durante 30 días si se almacena a 2...8 °C. En la solución de lavado concentrada es posible observar la presencia de cristales. En ese caso, agitar a temperatura ambiente hasta que los cristales se disuelvan por completo. Para una mayor precisión, diluir todo el frasco de la solución de lavado concentrada en 500 ml teniendo cuidado para transferir también los cristales y, a continuación, agitar hasta que se disuelvan por completo.

6.7. Control

El frasco contiene 0,5 ml de solución de control específica para cada lote. La concentración se encuentra indicada en la etiqueta. El control viene listo para ser usado.

7. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe llevarse a cabo usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel para la separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina sódica o EDTA de potasio). Almacene la muestra a -20 °C si la determinación no se realiza el mismo día de la recogida de la muestra. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con una batidora giratoria.

<i>Almacenamiento de muestras</i>	<i>Duración</i>
2...8 °C	24 horas
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

8. PROCEDIMIENTO

8.1. Preparación de la prueba

Por favor, lea detenidamente las instrucciones de uso de la prueba **antes** de realizar el ensayo. La confiabilidad de los resultados depende del seguimiento estricto de las instrucciones de uso de la prueba tal cual se describe en el inserto. Antes de comenzar, especifique exactamente la repartición y posición de las muestras y de los estándares/controles. Seleccione el número necesario de tiras de microtitulación o pozos e insértelos en el soporte para tiras. El pipeteo de las muestras no debe tomar más de diez minutos para evitar desviaciones en el ensayo. Si utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta.

Por favor, destinar al menos:

1 pozo (por ejemplo, A1)	para el blanco del sustrato
2 pozos (por ejemplo, B1+C1)	para el estándar 0
2 pozos (por ejemplo, D1+E1)	para el estándar 1
2 pozos (por ejemplo, F1+G1)	para el estándar 2
2 pozos (por ejemplo, H1+A2)	para el estándar 3
2 pozos (por ejemplo, B2+C2)	para el estándar 4
2 pozos (por ejemplo, D2+E2)	para el estándar 5
2 pozos (por ejemplo, F2+G2)	para el control

Es necesario analizar los estándares, el control y las muestras de los pacientes por duplicado.

Realice todos los pasos del ensayo en el orden indicado y sin retrasos apreciables entre los pasos.

Debe usar una punta desechable limpia para la dosificación de cada estándar y cada muestra.

1. Agregue 25 µl de estándares, control y muestras en sus respectivos pozos. Agregue 200 µl de conjugado a cada pozo. Deje el pozo A1 libre para el blanco.
2. Cubra los pozos con la lámina autoadhesiva suministrada en el kit.
3. **Incube por 2 horas a 37 °C.**
4. Cuando se complete el tiempo de incubación, retire la lámina autoadhesiva suministrada, aspire el contenido de los pozos y lave cada pozo tres veces con 300 µl de solución de lavado diluida. Evite desbordamientos entre los pozos de reacción.

Nota importante: Agite suavemente la placa durante 5 segundos en cada paso del lavado. Después del último lavado asegúrese haber eliminado completamente la solución de lavado de los pozos, invierta la placa y golpéea repetidas veces contra una servilleta de papel absorbente.

Lavados automático: Si está utilizando una lavadora automática, hacer 5 lavados.

Nota: ¡El lavado es crítico! Un lavado insuficiente resulta en una mala precisión y valores de absorbancia falsamente elevados.

5. Agregue 100 µl de solución de sustrato TMB a todos los pozos.
6. **Incube durante exactamente 30 minutos a temperatura ambiente (22...28 °C) en oscuridad.**
7. Agregue 100 µl de solución de parada a todos los pozos en el mismo orden y a la misma velocidad a la que agregó la solución de sustrato TMB. Agite la microplaca suavemente.
Cualquier color azul desarrollado durante la incubación se convertirá en amarillo.
8. Mida la absorbancia (E) de la muestra a 450 nm frente a una segunda lectura de referencia a 620-630 nm o frente al blanco entre 5 minutos.

8.2. Medición

Ajuste el lector de placas de micropozos de ELISA a **cero** usando el **blanco del sustrato del pozo A1**.

¡Si - por razones técnicas - no puede ajustar el lector de ELISA a cero usando el blanco del sustrato del pozo A1, reste el valor de la absorbancia del pozo A1 a todos los demás valores de absorbancia medidos con el fin de obtener resultados confiables!

Medir la **extinción** de todos los pocillos con **450 nm** y anotar los resultados de los estándares/controles y de las muestras.

Cuando sea necesario, calcule la **absorbancia media** de todos los duplicados.

9. CONTROL DE CALIDAD

Las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) requieren el uso de muestras de control de calidad en cada serie de ensayos para comprobar el rendimiento del ensayo. Los controles deberán tratarse como muestras desconocidas y los resultados deberán analizarse con métodos estadísticos adecuados.

El kit de control incluido en el kit deberá ser probado como desconocido y está destinado a ayudar a evaluar la validez de los resultados obtenidos con cada placa de ensayo.

Recomendamos a los usuarios que mantengan registros gráficos de los valores de control que se generan con cada ensayo, incluida la media de ejecución, la DE (desviación estándar) y el % CV. Esta información facilitará los ensayos de tendencia de los controles relacionados con el rendimiento de lotes de control actuales e históricos relativos a los datos de control de calidad proporcionados. La tendencia facilitará la identificación de los ensayos que generan valores de control significativamente distintos de su intervalo medio.

Al interpretar los datos de control, los usuarios deberán tener en cuenta que este producto fue diseñado y desarrollado como un producto manual. El rango establecido en el "Certificate of Analysis" (CoA) deberá ser adecuado para los ensayos que se realizan manualmente y en estricto cumplimiento del procedimiento de ensayo anteriormente descrito. Los profesionales del control de calidad reconocen que, como resultado de las diferencias en las condiciones y en las prácticas, siempre habrá variaciones entre laboratorios en los valores medios y en la precisión de las mediciones de control⁷.

10. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Hay disponibles diversos paquetes de software de reducción de datos que se pueden utilizar para generar el promedio de la curva de calibración y para calcular el promedio de las concentraciones de muestras y controles desconocidos. Se recomienda un ajuste de curva logístico de 4 parámetros (4PL), **incluido el estándar 0**.

También se puede preparar una curva de calibración en papel semilogarítmico mediante el trazado de la absorbancia media en el eje Y frente a la concentración de analitos en el eje X. El calibrador 0 debe incluirse en la curva de calibración. Lea el valor de absorbancia medio de cada muestra desconocida que se encuentra fuera de la curva.

Conversión de unidades

Para convertir los resultados a unidades del SI:

$$\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3,671$$

11. RANGO DE MEDICIÓN

El rango de medición del ensayo (AMR) es de 29,6 – 2000 pg/mL (108,7 – 7342 pmol/L).

Cualquier valor inferior a 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L) deberá comunicarse como “< 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L)”. Cualquier valor superior a 2000 pg/mL (7342 pmol/L) deberá comunicarse como “> 2000 pg/mL (7342 pmol/L)”.

12. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

Los calibradores de este kit son trazables al patrón de 17β-Estradiol del Instituto Nacional de Metrología de Japón (6004-a).

13. VALORES ESPERADOS

Los rangos siguientes se determinaron usando el 17 beta-Estradiol y se facilitan solo con fines informativos. El intervalo de referencia del 90 % para adultos aparentemente sanos se calcularon mediante un método no paramétrico siguiendo la orientación de CLSI C28-A3 “Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory”.

Adultos	n	Mediana (pg/mL)	Intervalo de referencia (pg/mL)
Hombres	120	34,3	<29,6 – 64,2
Mujeres			
Phase lutéale	40	71,6	<29,6 – 212,4
Phase folliculaire	39	46,5	<29,6 – 135,6
Phase ovulatoire	41	57,1	<29,6 – 273,5
Post-ménopause	120	32,9	<29,6 – 65,8
Grossesse			
1 ^{er} trimestre	40	1120,1	301,2 – >2000
2 ^e trimestre	39	>2000	1850,3 – >2000
3 ^e trimestre	40	>2000	>2000

Niños	n	Mediana (pg/mL)	Intervalo de referencia (pg/mL)
Mujeres			
1-10 años	39	56,7	<29,6 – 115,1
10-15 años	41	79,8	46,9 – 155,5
15-19 años	40	138,3	88,8 – 264,1
Hombres			
1-10 años	40	58,5	<29,6 – 115,7
10-15 años	39	39,2	<29,6 – 105,1
15-19 años	39	31,7	<29,6 – 91,3

Los rangos anteriores deberán ser considerados como directrices solamente; se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango previsto en función de su propia población de pacientes.

14. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

Se muestran los datos de rendimiento representativos. Los resultados obtenidos en diferentes laboratorios pueden diferir.

14.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

Sensibilidad	Concentración
Límite de blanco (LoB)	6,8 pg/mL
Límite de detección (LoD)	14,6 pg/mL
Límite de cuantificación (LoQ)	29,6 pg/mL

14.2. Veracidad

Se ha demostrado la veracidad mediante una prueba de recuperación para 17 beta-Estradiol con el estándar de 17β-Estradiol del Instituto Nacional de Metrología de Japón (código 6004-a).

14.3. Precisión

La precisión de 17 beta-Estradiol se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

Repetibilidad

Se analizó un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los datos de un lote representativo:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Intraprueba (repetibilidad)	
			DE	CV%
1	75	51,7	6,1	11,9%
2	75	134,2	11,3	8,4%
3	75	264,0	25,4	9,6%
4	75	627,7	56,4	9,0%
5	75	838,1	61,5	7,3%
6	75	1346,6	120,2	8,9%

Reproducibilidad

Se analizó un total de 6 muestras de suero en 5 réplicas, una vez al día durante 5 días por 3 operadores.

A continuación, se muestran los resultados de los datos combinados de 2 lotes:

Muestra	n	Concentración media (pg/mL)	Dentro del laboratorio (reproducibilidad)	
			DE	CV%
1	150	52,4	8,2	15,7%
2	150	139,0	21,2	15,3%
3	150	274,7	39,0	14,2%
4	150	633,9	66,0	10,4%
5	150	860,0	95,3	11,1%
6	150	1374,7	159,8	11,6%

14.4. Linealidad

La linealidad se evaluó en base a CLSI EP-06, "Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures». Para la concentración de estradiol mediante 17 beta-Estradiol, la medición muestra linealidad para el intervalo de 16,5 a 2271,3 ng/mL (60,57 hasta 8337,9 nmol/L) dentro de la desviación de linealidad permitida (ADL) de $\pm 15\%$.

14.5. Comparación de métodos

El 17 beta-Estradiol se comparó con un ensayo cuantitativo automático disponible en el mercado, siguiendo CLSI EP-09C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con cada método, se realizó el ensayo de un total de 106 muestras, seleccionadas para representar un amplio intervalo de concentraciones. Se realizó el análisis de regresión Lineal/Passing-Bablok/Deming sobre los datos comparativos:

n	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
106	0,98 [0,93 - 1,04]	14,5 [8,6 - 18,2]	0,99

14.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración analizada	Promedio en % de reactividad cruzada
Estriol	100 ng/mL	1,0%
Estrona	100 ng/mL	0,9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0,4%
Testosterona	100 ng/mL	0,0%
Cortisol	1000 ng/mL	0,0%
Progesterona	200 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0,0%
17OH-progesterona	100 ng/mL	0,0%
5 α -dihidrotestosterona (DHT)	500 ng/mL	0,0%

Reaccionante cruzado	Concentración analizada	Promedio en % de reactividad cruzada
Androstenediona	100 ng/mL	0,0%
Androsterona	100 ng/mL	0,0%
Cortisona	1000 ng/mL	0,0%
Prednisolona	200 ng/mL	0,0%
Danazol	1000 ng/mL	0,0%
2-metoxiestradiol	10 ng/mL	0,7%
17 α -etinilestradiol	200 ng/mL	0,0%
17 β -estradiol/17-sulfato	100 ng/mL	0,0%

Las siguientes sustancias no interfieren con un sesgo de $> \pm 15\%$ en el ensayo 17 beta-Estradiol cuando las concentraciones están por debajo del umbral indicado presentado en la siguiente tabla.

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	3,89 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	640 mg/dL
Proteína total	8,3 g/dL
Triglicéridos	2000 mg/dL

14.7. Estudio en suero-plasma

El estudio de comparación de la matriz 17 beta-Estradiol se realizó para evaluar la diferencia entre los tipos de tubos (tubos separadores de suero [SST], plasma de heparina de litio, plasma de heparina sódica y plasma K2 EDTA) frente a las muestras de control (tapón rojo para suero, sin aditivos) siguiendo las directrices CLSI EP35. Se evaluaron un total de 22 muestras (18 naturales, 4 enriquecidas). Se realizó el análisis de regresión de Passing y Bablok en los datos comparativos:

Tipo de muestra	Pendiente [IC del 95 %]	Intersección (pg/mL) [IC del 95 %]	Coefficiente de correlación (r)
SST	1,03 [0,98 – 1,07]	-3,5 [-37,2 – 30,2]	1,00
Heparina de litio	1,04 [0,97 – 1,12]	-0,8 [-59,0 – 57,4]	0,99
Heparina sódica	1,10 [1,03 – 1,17]	-8,05 [-62,2 – 46,1]	0,99
EDTA	1,06 [1,01 – 1,11]	-7,6 [-46,3 – 31,1]	0,99

15. LIMITACIONES DEL ENSAYO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos in vitro. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

16. PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

- El procedimiento de la prueba, la información, precauciones y advertencias contenidas en las instrucciones de uso deben ser seguidas estrictamente. El uso de los kits con analizadores y equipos similares debe ser validado. No se autoriza realizar ningún cambio en el diseño, composición y procedimiento del ensayo, así como ningún uso en combinación con otros productos no aprobados por el fabricante; el usuario es responsable de tales cambios. El fabricante no se hace responsable por resultados falsos o por cualquier incidente causado por esta razón. El fabricante no se responsabiliza por los resultados obtenidos mediante el análisis visual de las muestras de los pacientes.
- Este kit está destinado al uso in vitro realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.
- Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos ha sido sometido a pruebas que han dado resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, el HbsAg y el VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los calibradores y los controles deben manejarse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.
- El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.
- Algunos reactivos contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN₃) como conservante.

- La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas. Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.
- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/H₂O₂ a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.
- La importancia clínica de la determinación del 17β-estradiol puede quedar invalidada si el paciente fue tratado con cortisona o esteroides naturales o sintéticos.
- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22...28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales. No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.
- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente probado.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.

16.1. Nota de seguridad para los reactivos que contienen sustancias peligrosas

Los reactivos pueden contener CMIT/MIT (3:1) (consulte el cap. 4.1).

Por lo tanto, se aplican las indicaciones de peligro y consejos de prudencia.

Atención



H317	Puede provocar una reacción alérgica en la piel.
P261	Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.
P280	Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.
P302+P352	EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua abundantes.
P333+P313	En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.
P362+P364	Quitarse las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

Se puede encontrar más información en la ficha de datos de seguridad.

16.2. CONSIDERACIONES PARA EL DESCARTE

Residuos de químicos y preparaciones generalmente se consideran como desechos peligrosos. La eliminación de esta clase de desechos está regulada mediante leyes y regulaciones nacionales y regionales. Contactar a sus autoridades locales o compañías de manejo de desechos que den asesoría en como disponer los residuos peligrosos.

Para obtener información sobre los materiales de embalaje, consulte MATERIALES DE EMBALAJE.

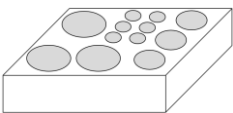
17. INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

REF	DNOV003	17 beta-Estradiol	(96 Determinaciones)
------------	---------	-------------------	----------------------

LITERATURE / BIBLIOGRAPHIE / BIBLIOGRAFÍA

1. Smy L, Straseski JA. Measuring estrogens in women, men, and children: Recent advances 2012-2017. *Clin Biochem.* 2018 Dec;62:11-23.
2. Rosner W, Hankinson SE, Sluss PM, Vesper HW, Wierman ME. Challenges to the measurement of estradiol: an endocrine society position statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):1376-87.
3. van Hellemond IEG, Vriens IJH, Peer PGM, Swinkels ACP, *et al.*; Dutch Breast Cancer Research Group (BOOG). Ovarian Function Recovery During Anastrozole in Breast Cancer Patients With Chemotherapy-Induced Ovarian Function Failure. *J Natl Cancer Inst.* 2017 Dec 1;109(12).
4. Katulski K, Slawek S, Czyzyk A, Podfigurna-Stopa A, *et al.* Bone mineral density in women with polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2014 Dec;37(12):1219-24.
5. Cameron DA, Douglas S, Brown JE, Anderson RA. Bone mineral density loss during adjuvant chemotherapy in premenopausal women with early breast cancer: is it dependent on oestrogen deficiency? *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Oct;123(3):805-14.
6. Decaroli MC, Rochira V. Aging and sex hormones in males. *Virulence.* 2017 Jul 4;8(5):545-570.
7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27–33

PACKAGING MATERIALS / MATERIELS D'EMBALLAGE / MATERIALES DE EMBALAJE

 PAP 21	 PAP 21	 PAP 22	MTP  ALU / LDPE 90
---	---	--	---

SYMBOLS KEY / EXPLICATION DES SYMBOLES / SIMBOLOS

	Manufactured by / Fabriqué par/ Fabricado por
IVD	In Vitro Diagnostic Medical Device / Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i> / Producto para diagnóstico In vitro
LOT	Lot Number / Numéro de lot / Número de lote
	Expiration Date / Date de péremption / Fecha de caducidad
	Storage Temperature / Température de conservation / Temperatura de almacenamiento
	Keep away from sunlight / Protéger de rayonnement solaire / Mantener alejado de la luz solar
CE	CE Mark / Marquage CE / Marca CE
REF	Catalogue Number / Référence du catalogue / Número de Catálogo
	Consult Instructions for Use / Consulter la notice d'utilisation / Consulte las Instrucciones de Uso
MTP	Microtiterplate / Plaque de Microtitrage / Placa de Microtitulación
CONJ	Conjugate / Conjugué / Conjugado
CONTROL	Control / Contrôle / Control
CAL	Calibrator resp. Standard / Standard o Étalon / Estándar o Calibrador
SOLN STOP	Stop Solution / Solution d'arrêt / Solución de Parada
SUB TMB	TMB Substrate Solution / Solution de Substrat TMB / Solución de Sustrato TMB
WASH BUF 10x	Wash Solution 10x concentrated / Solution de lavage concentré 10 x / Solución de lavado concentrado x10
	Contains sufficient for "n" tests/ Contenu suffisant pour "n" tests / Contenido suficiente para "n" tests

SCHEME OF THE ASSAY

17 beta-Estradiol

Test Preparation

Prepare reagents and samples as described.
Establish the distribution and identification plan for all samples and standards/controls.
Select the required number of microtiter strips or wells and insert them into the holder.

Assay Procedure

	Substrate blank	Standard 1 – 5	Control	Sample
Standard 1 – 5	-	25 µl	-	-
Control	-	-	25 µl	-
Sample	-	-	-	25 µl
Conjugate	-	200 µl	200 µl	200 µl
Cover wells with foil supplied in the kit Incubate for 2 hour at 37 °C Wash each well three times with 300 µl diluted wash solution In case you use automatic equipment, wash the wells at least 5 times.				
TMB Substrate Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Incubate for exactly 30 min at room temperature (22...28 °C) in the dark				
Stop Solution	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Shake the microplate gently Photometric measurement at 450 nm, 620 – 630 nm				



Gold Standard Diagnostics Frankfurt GmbH

Waldstrasse 23 A6

63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49 6074 23698-0

Fax: +49 6074 23698-900

E-Mail: info.frankfurt@eu.goldstandarddiagnostics.com

Website: clinical.goldstandarddiagnostics.com

DNOV003_Estradiol_IFU_rev02_fromLot_6090BN