



IMMUNOASSAYS AND SERVICES

BIOGENIC AMINES & NEUROSCIENCE | ENDOCRINOLOGY | FOOD SAFETY

LABOR DIAGNOSTIKA NORD GmbH & Co.KG | Am Eichenhain 1 | 48531 Nordhorn | Germany | Tel. +49 5921 8197-0 | Fax +49 5921 8197-222 | info@ldn.de | www.ldn.de

Instructions for use

Estradiol ELISA

REF

FR E-2000



IVD



Intended Use

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

Summary and explanation

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

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

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

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

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

PRINCIPLE

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

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

WARNINGS AND PRECAUTIONS

1. This kit is for in vitro use only. For professional use only.
2. Before starting the assay, read the instructions completely and carefully. Use the valid version of the package insert provided with the kit. Be sure that everything is understood.
3. The microplate contains snap-off strips. Unused wells must be stored at 2 °C to 8 °C in the sealed foil pouch and used in the frame provided.
4. Pipetting of samples and reagents must be done as quickly as possible and in the same sequence for each step.
5. Use reservoirs only for single reagents. This especially applies to the substrate reservoirs. Using a reservoir for dispensing a substrate solution that had previously been used for the conjugate solution may turn solution colored. Do not pour reagents back into vials as reagent contamination may occur.
6. Mix the contents of the microplate wells thoroughly to ensure good test results. Do not reuse microwells.
7. Do not let wells dry during assay; add reagents immediately after completing the rinsing steps.
8. Allow the reagents to reach room temperature (21-26°C) before starting the test. Temperature will affect the absorbance readings of the assay. However, values for the samples will not be affected.

9. Never pipet by mouth and avoid contact of reagents and specimens with skin and mucous membranes.
10. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.
11. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents or specimens may give false results.
12. Handling should be done in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guideline or regulation.
13. Do not use reagents beyond expiry date as shown on the kit labels.
14. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microtiterplate readers.
15. Do not mix or use components from kits with different lot numbers. It is advised not to exchange wells of different plates even of the same lot. The kits may have been shipped or stored under different conditions and the binding characteristics of the plates may result slightly different.
16. Avoid contact with Stop Solution. It may cause skin irritation.
17. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guideline or regulation.
18. For information please refer to Material Safety Data Sheets. Safety Data Sheets for this product are available upon request directly from the manufacturer.

REAGENTS

Reagents provided

96

FR E-2031 Microtiterplate

12x8 (break apart) strips with 96 wells; Wells coated with anti-Estradiol antibody.

Standards

ready to use

	Cat. no.	Standard	Concentration	Volume/Vial
STANDARD A	FR E-2001	Standard A (0)	0 pg/ml	0.3 ml
STANDARD B	FR E-2002	Standard B (1)	25 pg/ml	0.3 ml
STANDARD C	FR E-2003	Standard C (2)	75 pg/ml	0.3 ml
STANDARD D	FR E-2004	Standard D (3)	225 pg/ml	0.3 ml
STANDARD E	FR E-2005	Standard E (4)	675 pg/ml	0.3 ml
STANDARD F	FR E-2006	Standard F (5)	2000 pg/ml	0.3 ml

CONTROL 1

+ CONTROL 2

FR E-2051 + FR E-2052 Control low / Control high

2 vials, 0.3 ml each, ready to use containing Estradiol in human serum-buffer matrix.
For control values and ranges please refer to QC-Datasheet

CONJUGATE

FR E-2040 Enzyme Conjugate

1 vial, 11 ml, ready to use; 17 β -Estradiol labeled horseradish peroxidase in buffered matrix.

SUBSTRATE

AR E-0055 Substrate Solution

1 vial, 22 ml each, ready to use; tetramethylbenzidine (TMB)

STOP-SOLN

AR E-0080 Stop Solution

1 vial, 7 ml, ready to use; contains 2 N hydrochloric solution

WASH-CONC 10x

AR E-0030 Wash Solution

1 vial, 50 ml (10X concentrated);
see "Reagent Preparation".

Note: Additional Standard A for sample dilution is available upon request.

Materials required but not provided

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

Storage conditions

When stored at 2°C to 8°C unopened reagents will be stable until expiration date. Do not use reagents beyond this date. Opened reagents must be stored at 2°C to 8°C for 30 days. Microtiter wells must be stored at 2°C to 8°C. Take care that the foil bag is sealed tightly.

Reagent preparation

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

Wash Solution:

Dilute 50 mL of 10X concentrated *Wash Solution* with 450 mL deionized water to a final volume of 500 mL. *The diluted Wash Solution is stable for at least 3 months at room temperature (21-26°C).*

Disposal of the kits

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

Damaged test kits

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

SPECIMEN

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

ASSAY PROCEDURE

General Remarks

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

Assay procedure

Each run must include a standard curve.

1. Prepare a sufficient number of microplate wells to accommodate standards and samples in duplicates.
2. Dispense 25 µL of each Standard, Sample and Control <u>with new disposable tips</u> into appropriate wells.
3. Incubate for 60 minutes at room temperature on a plate shaker (> 600 rpm).
4. Add 100 µL of Enzyme Conjugate into each well.
5. Incubate for 60 minutes at room temperature on a plate shaker (> 600 rpm) Important Note: Optimal reaction in this assay is markedly dependent on shaking of the microplate!
6. Discard the content of the wells and rinse the wells 4 times with diluted Wash Solution (300 µL per well). Remove as much Wash Solution as possible by beating the microplate on absorbent paper.
7. Add 200 µL of Substrate Solution to each well.
8. Incubate without shaking for 30 minutes in the dark.
9. Stop the reaction by adding 50 µL of Stop Solution to each well.
10. Determine the absorbance of each well at 450 nm. It is recommended to read the wells within 15 minutes.

Calculation of results

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

Example of typical standard curve

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

Standard	Optical Units (450nm)
Standard A (0 pg/mL)	2.738
Standard B (25 pg/mL)	2.439
Standard C (75 pg/mL)	1.999
Standard D (225 pg/mL)	1.320
Standard E (675 pg/mL)	0.711
Standard F (2000 pg/mL)	0.346

EXPECTED VALUES

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

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

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

n.d.= non detectable

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

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Analytical Sensitivity

The lowest analytical detectable level of Estradiol that can be distinguished from Standard A is 6.2 pg/mL at the 2SD confidence limit.

Specificity (Cross Reactivity)

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

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

Assay dynamic range

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

Reproducibility

Intra-Assay

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

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

Inter-Assay

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

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

Recovery

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

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

Linearity

Three serum samples were assayed undiluted and diluted with Standard A.

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

LIMITATIONS OF PROCEDURE

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

Drug Interferences

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

LEGAL ASPECTS

Reliability of Results

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

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

Therapeutic Consequences

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

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

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

Liability













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

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

REFERENCES

1. Tsang, B.K., Armstrong, D.T. and Whitfield, J.F., Steroid biosyntheses by isolated human ovarian follicular cells in vitro, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51:1407 - 11 (1980).
2. Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T., Follicular steroidogenesis and its control. In: The physiology of Reproduction, Ed.: Knobil, E., and Neill, J. et al., pp. 331-85. *Raven Press, New York* (1988).
3. Hall, P.F., Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. In: The Physiology of Reproduction, Ed.: Knobil, E., and Neill, J. et al., pp 975-98. *Raven Press, New York* (1988).
4. Siiteri, P.K. Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. and Kuhn, R.W., The serum transport of steroid hormones, *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:457 - 510 (1982).
5. Martin, B., Rotten, D., Jolivet, A. and Gautray, J-P., Binding of steroids by proteins in follicular fluid of the human ovary, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 443-47 (1981).
6. Baird, D.T., Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In: The Endocrine Function of the Human Ovary. Eds.: James, V.H:T., Serio, M. and Giusti, G. pp. 125-33, *Academic Press, New York* (1976).
7. McNastty, K.P., Baird, D.T., Bolton, A., Chambers, P., Corker, C.S. and McLean, H., Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle, *J. Endocrinol.* 71:77-85 (1976).
8. Abraham, G.E., Odell, W.D., Swerdloff, R.S. and Hopper, K., Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 β during the menstrual cycle, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-18 (1972).
9. March, C.M., Goebelsmann, U., Nakumara, R.M., and Mishell, D.R., Roles of oestradiol and progesterone in eliciting midcycle luteinising hormone and follicle stimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:507-12 (1979).
10. Simpson, E.R. and McDonald, P.C., Endocrinology of Pregnancy. In: Textbook of Endocrinology, Ed.: Williams, R.H. pp412-22, *Saunders Company, Philadelphia* (1981).
11. Jenner, M.R., Kelch, R.P., et al., Hormonal Changes in prepubertal children, pubertal females and in precocious puberty, premature thelarche, hypogonadism and in a child with feminising tumour, *J. Clin. Endocrinol.* 34: 521 (1982).
12. Goldstein, D. et al., Correlation between oestradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency, *Fertil. Steril.* 37: 348-54 (1982).
13. Kirschner, M.A., The role of hormones in the etiology of human breast cancer, *Cancer* 39:2716 26 (1977).
14. Odell, W.D. and Swerdloff, R.D., Abnormalities of gonadal function in men, *Clin. Endocr.* 8:149-80 (1978).
15. McDonald, P.C., Madden, J.C., Brenner, P.F., Wilson, J.D. and Siiteri, P.K. Origin of oestrogen in normal men and women with testicular feminisation, *J.Clin. Endocrinol. Metabol.* 49:905 (1979).
16. Peckham, M.J: and McElwain, T.J:, Testicular tumours, *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 4:665-692 (1975).
17. Taubert, H.D. and Dericks-Tan, J.S.E., Induction of ovulation by clomiphene citrate in combination with high doses of oestrogens or nasal application of LH-RH. In: Ovulation in the Human. Eds.: Crosignandi, P.G. and Mishell, D.R., pp.265-73, *Academic Press, New York* (1976).
18. Fishel, S.B., Edwards, R.G., Purdy, J.M., Steptoe, P.C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J. Fehilly, C. Hewitt, J. and Rowland, G., Implantation, abortion and birth after in-vitro fertilisation using the natural menstrual cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin, *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1:24-28 (1985).
19. Wramsby, H., Sundstorm, P. and Leidholm, P., Pregnancy rate in relation to number of cleaved eggs replaced after in vitro-fertilisation of stimulating cycles monitored by serum levels of oestradiol and progesterone as sole index. *Human Reproduction* 2: 325-28 (1987).
20. Ratcliff, W.A., Carter, G.D. et al., Estradiol assays: applications and guidelines for the provision of clinical biochemistry service, *Ann. Clin. Biochem.* 25:466-483 (1988).
21. Tietz, N.W., *Textbook of Clinical Chemistry.* Saunders, 1986.

Symbols:

	Storage temperature		Manufacturer		Contains sufficient for <n> tests
	Expiry date		Batch code		For in-vitro diagnostic use only!
	Consult instructions for use		Content		CE labelled
	Caution		Catalogue number		For research use only!

EINLEITUNG

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

TESTPRINZIP

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

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

VORSICHTSMAßNAHMEN

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

18. Informationen zu im Kit enthaltenen gefährlichen Substanzen entnehmen Sie bitte dem Material Sicherheitsdatenblatt. Material Sicherheitsdatenblätter für dieses Produkt sind auf Anfrage direkt vom Hersteller erhältlich.

BESTANDTEILE DES KITS

Kitinhalt

96

FR E-2031 Mikrotiterplatte

12 x 8 (einzeln brechbare) Mikrotiterstreifen mit 96 Vertiefungen; beschichtet mit einem anti-Estradiol-Antikörper.

Standards

gebrauchsfertig

	Artikelnr.	Standard	Konzentration	Volumen/Flasche
STANDARD A	FR E-2001	Standard A (0)	0 pg/ml	0.3 ml
STANDARD B	FR E-2002	Standard B (1)	25 pg/ml	0.3 ml
STANDARD C	FR E-2003	Standard C (2)	75 pg/ml	0.3 ml
STANDARD D	FR E-2004	Standard D (3)	225 pg/ml	0.3 ml
STANDARD E	FR E-2005	Standard E (4)	675 pg/ml	0.3 ml
STANDARD F	FR E-2006	Standard F (5)	2000 pg/ml	0.3 ml

CONTROL 1

+ CONTROL 2

FR E-2051 + FR E-2052 Kontrolle niedrig / Kontrolle hoch

2 Fl., je 0.3 ml, gebrauchsfertig; enthält Estradiol in humaner Serum-Puffer Matrix. Kontrollwerte und -bereiche entnehmen Sie bitte dem QC-Datenblatt.

CONJUGATE

FR E-2040 Enzymkonjugat

1 Fläschchen, 11 ml, gebrauchsfertig; 17 β -Estradiol mit Meerrettichperoxidase konjugiert

SUBSTRATE

AR E-0055 Substratlösung

1 Fläschchen, 22 ml, gebrauchsfertig; Tetramethylbenzidin (TMB)

STOP-SOLN

AR E-0080 Stopplösung

1 Fläschchen, 7 ml, gebrauchsfertig; enthält 2 N Salzsäure.

WASH-CONC 10x

AR E-0030 Waschlösung

1 Fläschchen, 50 ml (10X konzentriert);
siehe „Vorbereitung der Reagenzien“.

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

Nicht im Kit enthaltene aber erforderliche Geräte und Materialien

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

Lagerung und Haltbarkeit des Kits

Die ungeöffneten Reagenzien behalten bei Lagerung um 2-8°C ihre Reaktivität bis zum Verfallsdatum. Nach dem Verfallsdatum die Reagenzien nicht mehr verwenden. Nach dem Öffnen sollten alle Reagenzien bei 2-8°C für maximal 30 Tage gelagert werden.

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

Vorbereitung der Reagenzien

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

Waschlösung

Die 10-fach konzentrierte Waschlösung (50 ml) mit 450 ml deionisiertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 ml verdünnen. *Die verdünnte Waschlösung ist bei Raumtemperatur (21-26°C) für mindestens 3 Monate stabil.*

Entsorgung des Kits

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

Beschädigte Testkits

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

PROBENVORBEREITUNG

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

TESTDURCHFÜHRUNG

Allgemeine Hinweise

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

Testdurchführung

Jeder Testlauf muss eine Standardkurve beinhalten.

1. Die benötigte Anzahl an Mikrotiterstreifen in der Halterung befestigen.
2. Je 25 µl Standards, Kontrollen und Proben mit <u>neuen Plastikspitzen</u> in die entsprechenden Vertiefungen geben.
3. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (>600 rpm) inkubieren.
4. 100 µl des Enzymkonjugates in jede Vertiefung geben.
5. 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Mikrotiterplatten-Schüttler (>600 rpm) inkubieren. Achtung: Eine optimale Reaktion wird erheblich beeinflusst durch das Schütteln der Mikrotiterplatte!
6. Den Inhalt der Vertiefungen kräftig ausschütten. Vertiefungen 4mal mit verdünnter Waschlösung (300 µl pro Vertiefung) waschen. Restliche Flüssigkeit durch Ausklopfen der Mikrotiterplatte auf saugfähigem Papier entfernen.
7. 200 µl Substratlösung in jede Vertiefung geben.
8. 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren.
9. Die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopp-Lösung in jede Vertiefung abstoppen.
10. Die Optische Dichte bei 450±10 nm mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät innerhalb von 15 Minuten nach Zugabe der Stopp-Lösung bestimmen.

Ergebnisermittlung

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

Beispiel für eine Standardkurve

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

Standard	Optische Dichte (450nm)
Standard A (0 pg/ml)	2.738
Standard B (25 pg/ml)	2.439
Standard C (75 pg/ml)	1.999
Standard D (225 pg/ml)	1.320
Standard E (675 pg/ml)	0.711
Standard F (2000 pg/ml)	0.346

ERWARTETE WERTE

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

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

n.d. = nicht detektierbar

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

ASSAY CHARACTERISTIKA

Analytische Sensitivität

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

Spezifität der Antikörper (Kreuzreaktivität)

Die Daten entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

Messbereich

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

Die Daten zu:

Präzision

Wiederfindung

Linearität

entnehmen Sie bitte der ausführlichen englischen Arbeitsanleitung.

GRENZEN DES TESTS

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

Beeinflussung durch Medikamente

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

RECHTLICHE GRUNDLAGEN

Zuverlässigkeit der Ergebnisse

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

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

Haftung







Jegliche Veränderungen des Testkits und/oder Austausch oder Vermischung von Komponenten unterschiedlicher Chargen von einem Testkit zu einem anderen, können die gewünschten Ergebnisse und die Gültigkeit des gesamten Tests negativ beeinflussen. Solche Veränderungen und/oder Austausch haben den Ausschluss jeglicher Ersatzansprüche zur Folge.

Im Falle jeglicher Reklamation ist die Haftung des Herstellers maximal auf den Wert des Testkits beschränkt. Jegliche Schäden, die während des Transports am Kit entstanden sind, unterliegen nicht der Haftung des Herstellers.

REFERENZEN

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

Symbole:

	Lagertemperatur		Hersteller		Enthält Testmaterial für <n> Teste
	Verwendbar bis	LOT	Chargennummer	IVD	In vitro Diagnostikum
	Vor Gebrauch Packungsbeilage lesen	CONT	Inhalt	CE	CE gekennzeichnet
	Achtung	REF	Katalog-Nummer	RUO	Nur für Forschungszwecke