

Instructions for use
Estrone ELISA

REF

FR E-2300


96


+2 / +8 °C

IVD

CE

Estrone ELISA

English

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Estrone by enzyme immunoassay in human serum. For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in standards, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of estrone in the sample. A set of standards is used to plot a standard curve from which the amount of estrone in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Estrone is a steroid like estriol and estradiol, belonging to the class of estrogens. The estrogens are involved in the development of female sex organs and secondary sex characteristics. Before the ovum is fertilized the main action of the estrogens is on the growth and function of the reproductive tract in order to prepare it for the fertilized ovum.

During the follicular phase of the menstrual cycle the estrone level shows a slight increase. The production of estrone then increases markedly to peak at around day 13. The peak is of short duration and by day 16 of the cycle levels will be low. A second peak occurs at around day 21 of the cycle and if fertilization does not occur, then the production of estrone decreases.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

- Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
- Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
- When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
- In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
- All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
- A standard curve must be established for every run.
- The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
- Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
- When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
- The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
- When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
- To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, standard and control.
- Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
- Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

- All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of estrone in human serum. The kit is not calibrated for the determination of estrone in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.
- Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
- Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
- Only standard A may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
- The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS
POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the standards and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.

SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

- Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
- Disposable pipette tips
- Distilled or deionized water
- Plate shaker
- Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED

AA E-0030 WASH-CONC ~~10x~~ **Wash Buffer Concentrate – X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.
Volume: 50 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.
Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 mL of the wash buffer concentrate in 450 mL of water.

AA E-0055 SUBSTRATE **TMB Substrate - Ready To Use.**

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.
Volume: 16 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

AA E-0080 STOP-SOLN **Stopping Solution - Ready To Use.**

Contents: One vial containing 1M sulfuric acid.
Volume: 6 mL/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Standards and Controls- Ready To Use.

Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations:

Cat. no.	Symbol	Standard	Concentration	Volume/Vial
FR E-2301	STANDARD A	Standard A (0)	0 pg/ml	2.0 ml
FR E-2302	STANDARD B	Standard B (1)	15 pg/ml	0.5 ml
FR E-2303	STANDARD C	Standard C (2)	50 pg/ml	0.5 ml
FR E-2304	STANDARD D	Standard D (3)	200 pg/ml	0.5 ml
FR E-2305	STANDARD E	Standard E (4)	800 pg/ml	0.5 ml
FR E-2306	STANDARD F	Standard F (5)	2000 pg/ml	0.5 ml
FR E-2351	CONTROL 1	Control 1	Refer to vial labels for expected value and acceptable range!	0.5 ml
FR E-2352	CONTROL 2	Control 2		0.5 ml

Contents: Estrone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with a defined quantity of estrone.

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the standards should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

FR E-2313 **ASSAY-BUFF** **Assay Buffer - Ready To Use.**

Contents: One vial containing a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 15 mL/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

FR E-2331 **96** **Rabbit Anti-Estrone Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.**

Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

FR E-2340 **CONJUGATE-CONC 100x** **Avidin-Horse Radish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate - X100**

Contents: Avidin-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.

Volume: 0.2 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

FR E-2341 **BIO-AB-CONC 100x** **Estrone-Biotin Antibody Concentrate - X100**

Contents: Estrone-Biotin Antibody in a protein-based buffer with a non-mercury preservative

Volume: 0.2 mL/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C


Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation of Estrone-Biotin:Avidin-HRP conjugate working solution FR E-2340 + FR E-2341

Dilute both the estrone-biotin and avidin-HRP concentrates 1:100 into the same solution of assay buffer and mix thoroughly (eg. To a tube containing 2ml of assay buffer add 20µl of estrone-biotin and avidin-HRP conjugate concentrates).

ASSAY PROCEDURE

All reagents must reach room temperature before use. Standards, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solutions of the estrone-biotin: avidin-HRP conjugate and wash buffer . After conjugate working solution is prepared, it is essential that it be mixed and allowed to stand for at least 15 minutes prior to use.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 µl of each standard, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µL of the conjugate working solution into each well. <i>(We recommend using a multichannel pipette).</i>
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 1 hour at room temperature .
6. Wash the wells 3 times with prepared wash buffer (300 µL/well for each wash) and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry <i>(The use of a washer is recommended).</i>
7. Pipette 150 µL of TMB substrate into each well at timed intervals.
8. Incubate the plate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature . <i>(or until Standard A attains dark blue colour for desired OD).</i>
9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.
10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.
 <i>If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450nm filter is unavailable, a 405 or 415nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.</i>

CALCULATIONS

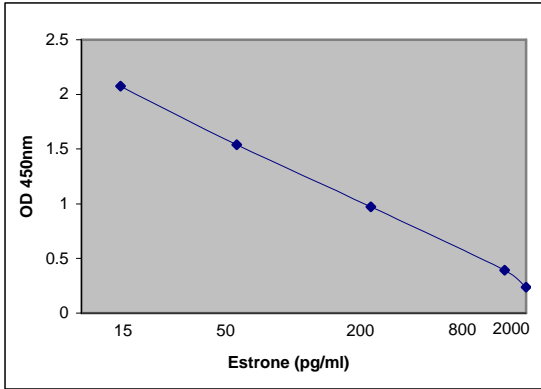
- Calculate the mean optical density of each standard duplicate.
- Draw a standard curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the standard concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
- Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
- Read the values of the unknowns directly off the standard curve.
- If a sample reads more than 2000 pg/ml then dilute it with standard A at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA:

Standard	OD 1	OD 2	Mean OD	Value (pg/ml)
A	2.162	2.175	2.169	0
B	1.805	1.935	1.870	15
C	1.470	1.473	1.472	50
D	0.697	0.671	0.684	200
E	0.352	0.345	0.349	800
F	0.222	0.213	0.218	2000
Unknown	1.290	1.350	1.320	65

TYPICAL STANDARD CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

The lower detection limit is calculated from the standard curve by determining the resulting concentration of the mean OD of Standard A (based on 10 replicate analyses) minus 2 SD. Therefore, the sensitivity of the Direct Estrone ELISA kit is **10.0 pg/ml**.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Estrone ELISA kit with estrone cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
Estrone	100
Estrone-3-Sulfate	4.9
17β-Estradiol	2.2
Estrone-3-Glucuronide	1.2
17β-Estradiol-3-Glucuronide	0.14

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.1%: Androstenedione, Cholesterol, Corticosterone, Cortisol, Cortisone, DHEAS, Diethylstilbesterone, Estriol, 17β-Estradiol-3-Glucuronide, Estradiol-Sulfate, Progesterone, 17-OH Progesterone and Testosterone.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times each on the same standard curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	55.40	4.50	9.1
2	250.50	16.78	6.7
3	1563.57	112.78	7.2

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed ten times over a period of four weeks. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	55.62	6.53	11.7
2	260.12	17.96	6.9
3	1478.63	145.63	9.9

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of estrone to three patient serum samples. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	52	-	-
+200	315	252	125
+400	557	452	120
+1000	1235	1052	117
2 Unspiked	75	-	-
+375	493	450	110
+750	505.23	559.81	90.3
+1500	712.44	794.88	89.6
3 Unspiked	720.11	-	-
+200	758.13	837.64	90.5
+400	856.46	955.17	89.7
+1000	1013.61	1190.24	85.1

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with standard A. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	340.67	-	-
1:2	165.35	170.34	97.1
1:4	95.39	85.17	112.0
1:8	48.47	42.58	113.8
2	1086.01	-	-
1:2	508.58	543.00	93.7
1:4	232.11	271.50	85.5
1:8	114.95	135.75	84.7
3	1313.21	-	-
1:2	612.98	656.61	93.4
1:4	318.63	328.30	97.1
1:8	134.98	164.15	82.2

COMPARATIVE STUDIES

The Direct Estrone ELISA kit (y) was compared with a competitors coated tube RIA kit (x). The comparison of 29 serum samples yielded the following linear regression results:

$$y=1.134x-7.014$$
$$r^2=0.99$$

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.













Group	Range (pg/ml)
Males	25-150
Females	25-350
Pregnancy	100-8000

REFERENCES

- Hauptmann. H. et al: Concepts for the synthesis of biotinylated steroids. Part 2: 17 β -estradiol derivatives as immunochemical probes. Bioconjugate Chem. 11(2000) 537- 548
- Dressendorfer R.A. et al: Synthesis of a cortisol-biotin conjugate and evaluation as a tracer in an immunoassay for salivary cortisol measurement. J. Steroid Biochem. Molec. Biol.: 43 (1992) 683-692
- Mayer H.H.D. et al: Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 β . J. Steroid Biochem. 35 (1990) 263-269
- Folan J. et al: Solid-phase Enzymeimmunoassay of estrone in serum. Clin. Chem. 34(1988) 1843-1846
- Folan J. et al: Solid-Phase Enzymeimmunoassay of estrone in saliva. Clin. Chem. 35:4(1989)569-572
- Speroff L. et al: Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: Clinical gynecologic endocrinology & infertility, 3rd ed. Willanms & Wilkins. 1983: 1-41
- Kim M.H. et al: Plasma levels of estrogen, androgens and progesterone during normal and dexamethasone-treated cycles. J. Clin. Endocrinol. Metab.. 39(1974)706-712
- Speight A.C. et al; Non-protein bound oestrogens in plasma and urinary excretion of unconjugated oestrogens in non-pregnant women. J. Endocrino 83(1979) 385-391

- Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chemistry 45:7, 1999.
- Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

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!

VERWENDUNGSZWECK

Für die direkte quantitative Bestimmung von Östron in Humanserum durch Enzymimmunoassay.

Nur zu *in-vitro*-Diagnosezwecken.

Deutsch

TESTPRINZIP

Das Prinzip des folgenden Enzymimmunoassays folgt dem typischen kompetitiven Bindungsszenario. Konkurrenz um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen auf der Mikrotiterplatte entsteht zwischen einem unmarkierten Antigen (in Standards, Kontrollen und Patientenproben vorhanden) und einem enzymmarkierten Antigen (Konjugat). Die Wasch- und Abgießschritte entfernen ungebundenes Material. Nach dem Waschschrift wird das Enzymsubstrat zugegeben. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe der Stopplösung beendet. Die Extinktion wird mit einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Die Intensität der gebildeten Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration von Östron in der Probe. Eine Reihe von Standards wird verwendet, um eine Standardkurve zu erzeugen, von der die Mengen von Östron in den Patientenproben und Kontrollen direkt abgelesen werden können.

KLINISCHE ANWENDUNGEN

Östron ist ein Steroid wie Östriol und Östradiol, die zur Klasse der Östrogene gehören. Die Östrogene sind an der Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane und sekundären Geschlechtsmerkmale beteiligt. Vor der Befruchtung des Eis wirken die Östrogene hauptsächlich auf das Wachstum und die Funktion der Fortpflanzungsorgane, um sie für die befruchtete Eizelle vorzubereiten.

Während der folliculären Phase des Menstruationszyklus zeigt der Östronspiegel einen leichten Anstieg. Die Produktion von Östron steigt dann deutlich an und erreicht etwa am 13. Tag ihr Maximum. Die Spitze ist von kurzer Dauer, und am 16. Tag des Zyklus ist der Spiegel wieder niedrig. Eine zweite Spitze tritt etwa am 21. Tag des Zyklus auf, und wenn keine Befruchtung stattfindet, nimmt die Östronproduktion ab.

VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE

- Anwender sollten für den erfolgreichen Einsatz dieses Kits das Protokoll gründlich verstanden haben. Zuverlässige Leistung wird nur durch strenge und sorgfältige Einhaltung der Anleitung erreicht.
- Kontrollmaterialien oder Serumpools sollten mit hoher und niedriger Konzentration in jeden Lauf zur Beurteilung der Zuverlässigkeit der Ergebnisse einbezogen werden.
- Wenn Wasser zur Verdünnung oder Rekonstitution zu verwenden ist, ist demineralisiertes oder destilliertes Wasser einzusetzen.
- Um Kontakt mit potenziell schädlichen Substanzen zu reduzieren, sollten bei der Handhabung der Testreagenzien und Humanproben Handschuhe getragen werden.
- Alle Reagenzien und Proben sollten vor Gebrauch auf Raumtemperatur gebracht und vorsichtig, aber gründlich durchgemischt werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen von Reagenzien und Proben.
- Für jeden Lauf muss eine Standardkurve erstellt werden.
- Die Kontrollen sollten in jeden Lauf eingeschlossen werden und innerhalb etablierter Vertrauensgrenzen liegen.
- Unsachgemäße Verfahrenstechniken, unpräzises Pipettieren, unvollständiges Waschen und unsachgemäße Lagerung der Reagenzien können in Frage kommen, wenn die Messwerte für die Kontrollen nicht in den etablierten Bereichen liegen.
- Beim Lesen der Mikrotiterplatte beeinflussen Blasen in den Wells die Extinktionswerte (ODs). Entfernen Sie vor dem Messschritt jegliche Blasen sorgfältig.
- Die Substratlösung (TMB) ist lichtempfindlich und sollte bei richtiger Lagerung farblos bleiben. Instabilität und Verunreinigung können an der Entstehung einer blauen Farbe erkannt werden, in welchem Fall die Lösung nicht verwendet werden sollte.
- Beim Dosieren von Substrat und Stopplösung verwenden Sie keine Pipetten, in denen diese Flüssigkeiten in Kontakt mit Metallteilen kommen.
- Um Kontamination der Reagenzien zu vermeiden, verwenden Sie zur Entnahme aller Reagenzien, Proben, Standards und Kontrollen jeweils eine neue Einweg-Pipettenspitze.
- Verschiedene Chargen von Kit-Komponenten sind innerhalb eines Tests nicht zu mischen, und keine Komponente darf nach dem Verfallsdatum auf dem Etikett verwendet werden.
- Kit-Reagenzien müssen gemäß nationalen Vorschriften als gefährlicher Abfall entsorgt werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

- Alle Reagenzien in dem Kit sind für die direkte Bestimmung von Östron in menschlichem Serum geeicht. Das Kit ist nicht für die Bestimmung von Östron in Speichel, Plasma oder anderen Proben menschlichen oder tierischen Ursprungs geeicht.
- Verwenden Sie keine stark hämolysierten, lipämischen, ikterischen oder unsachgemäß gelagerten Seren.
- Thimerosal enthaltende Proben oder Kontrollseren sind mit diesem Kit nicht kompatibel, da sie zu falschen Ergebnissen führen können.
- Nur Standard A darf verwendet werden, um Proben mit hoher Serumkonzentration zu verdünnen. Verwendung anderer Reagenzien kann zu falschen Ergebnissen führen.

- Die mit diesem Kit erhaltenen Ergebnisse sollten niemals als alleinige Grundlage für die klinische Diagnostik verwendet werden. Zum Beispiel hat das Auftreten heterophiler Antikörper bei Patienten, die regelmäßig Kontakt mit Tieren oder Tierprodukten haben, ein Störpotential für immunologische Tests. Daher sollte die klinische Diagnose alle Aspekte des Hintergrunds eines Patienten einschließlich der Häufigkeit seiner Exposition gegenüber Tieren/Tierprodukten berücksichtigen, wenn falsche Ergebnisse vermutet werden.

VORSICHTSMAßNAHMEN UND WARNHINWEISE
POTENZIELL INFEKTIÖSES MATERIAL

Humanserum, das zur Herstellung der Standards und Kontrollen verwendet werden kann, wurde auf das Hepatitis B-Oberflächen-Antigen sowie auf Antikörper gegen HCV und HIV getestet und für nichtreaktiv befunden. Jedoch kann keine Testmethode mit absoluter Sicherheit Freiheit von HIV, HCV und Hepatitis-B-Virus oder anderen infektiösen Erregern garantieren. Die Reagenzien sollten als potentielle Biogefährdungen betrachtet und mit den gleichen Vorsichtsmaßnahmen wie jede Blutprobe gehandhabt werden.

CHEMISCHE GEFAHREN

Kontakt mit Reagenzien, die TMB, Wasserstoffperoxid oder Schwefelsäure enthalten, vermeiden. Bei Kontakt mit einem dieser Reagenzien: mit viel Wasser abwaschen. TMB steht im Verdacht, krebserregend zu sein.

PROBENNAHME UND -LAGERUNG

Etwa 0,2 ml Serum ist pro Doppelbestimmung erforderlich. Nehmen Sie 4–5 ml Blut in ein entsprechend gekennzeichnetes Röhrchen auf und lassen es gerinnen. Zentrifugieren Sie und entfernen vorsichtig die Serumschicht. Lagerung bei 4 °C bis zu 24 Stunden oder bei -10 °C oder kälter, wenn die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden sollen. Betrachten Sie alle Humanproben als potentielle Biogefährdungen und ergreifen geeignete Schutzmaßnahmen beim Umgang.

PROBENVORBEHANDLUNG

Dieses Assay ist ein Direktsystem; keine Probenvorbehandlung ist notwendig.

BENÖTIGTE, ABER NICHT MITGELIEFERTE REAGENZIEN UND INSTRUMENTE

- Präzisionspipetten für 50, 100, 150 und 300 µl
- Einweg-Pipettenspitzen
- Destilliertes oder demineralisiertes Wasser
- Plattenschüttler
- Mikrotiterplattenlesegerät mit einem 450-nm-Filtersatz und einer oberen OD-Messgrenze von 3.0 oder höher *
 (siehe Assayverfahren Schritt 10).

MITGELIEFERTE REAGENZIEN

AA E-0030 **WASH-CONC** **10x** **Waschpufferkonzentrat - X10**

Inhalt: Eine Flasche Puffer mit nichtionischem Detergens und quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 50 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Vorbereitung: Vor der Verwendung 1:10 in destilliertem oder demineralisiertem Wasser verdünnen. Wenn die gesamte Platte verwendet werden soll, 50 ml Waschpufferkonzentrat mit 450 ml Wasser verdünnen.

AA E-0055 **SUBSTRATE** **TMB Substrat** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine Flasche Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid in einem DMF- und DMSO-freien Puffer.

Volumen: 16 ml/Flasche

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

AA E-0080 **STOP-SOLN** **Stopplösung** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen 1M Schwefelsäure.
 Volumen: 6 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Standards und **Kontrollen** – Gebrauchsfertig.

Nachfolgend sind ungefähre Konzentrationen angegeben; die genauen Konzentrationen finden sich auf den Etiketten der Fläschchen:

Kat.-Nr.	Zeichen	Standard	Konzentration	Volumen/Fläschchen
FR E-2301	STANDARD A	Standard A	0 pg/ml	2,0 ml
FR E-2302	STANDARD B	Standard B	15 pg/ml	0,5 ml
FR E-2303	STANDARD C	Standard C	50 pg/ml	0,5 ml
FR E-2304	STANDARD D	Standard D	200 pg/ml	0,5 ml
FR E-2305	STANDARD E	Standard E	800 pg/ml	0,5 ml
FR E-2306	STANDARD F	Standard F	2000 pg/ml	0,5 ml
FR E-2351	CONTROL 1	Kontrolle 1	Siehe Fläschchenetiketten für Erwartungswert und akzeptablen Bereich!	0,5 ml
FR E-2352	CONTROL 2	Kontrolle 2		0,5 ml

Inhalt: Östron in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel. Hergestellt durch Dotieren von Puffer mit einer definierten Menge Östron.

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate im ungeöffneten Fläschchen oder wie auf dem Etikett angegeben. Einmal geöffnet, sollten die Standards innerhalb von 14 Tagen verwendet oder aliquotiert und eingefroren gelagert werden. Mehrfache Einfrier- und Auftauzyklen sind zu vermeiden.

FR E-2313 **ASSAY-BUFF** **Assay-Puffer** – Gebrauchsfertig.

Inhalt: Ein Fläschchen mit proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 15 ml/Flasche
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

FR E-2331 - **96** **Mikrotiterplatte mit Anti-Östron-Kaninchenantikörper beschichtet - herausbrechbare Wells** - gebrauchsfertig.

Inhalt: Eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (12×8), mit polyklonalem Antikörper beschichtet, in einem wiederverschließbaren Beutel mit Trockenmittel.

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C

Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

FR E-2340 **CONJUGATE-CONC 100x** **Avidin-Meerrettichperoxidase (HRP) Konjugatkonzentrat - X100**

Inhalt: Avidin-HRP-Konjugat in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.
 Volumen: 0,2 ml/Fläschchen
 Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C
 Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

FR E-2341 **BIO-AB-CONC 100x** **Östron-Biotin-Antikörper-Konzentrat - X100**

Inhalt: Östron-Biotin-Antikörper in proteinhaltigem Puffer mit quecksilberfreiem Konservierungsmittel.

Volumen: 0,2 ml/Fläschchen

Lagerung: Gekühlt bei 2-8 °C


Stabilität: 12 Monate oder gemäß Angabe auf dem Etikett.

Herstellung von Östron-Biotin: Avidin-HRP-Konjugat-Arbeitslösung FR E-2340 + FR E-2341

Verdünnen Sie sowohl das Östron-Biotin- als auch das Avidin-HRP-Konzentrat 1:100 mit der gleichen Assay-Pufferlösung und mischen gründlich (geben Sie beispielsweise einem Röhrchen mit 2 ml Assay-Puffer 20 µl der Östron-Biotin- und Avidin-HRP-Konjugat-Konzentrate zu).

TESTVERFAHREN

Alle Reagenzien müssen vor der Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Standards, Kontrollen und Proben sollten jeweils doppelt getestet werden. Sobald das Verfahren begonnen wurde, sollten alle Arbeitsschritte ohne Unterbrechung durchgeführt werden.

1.	Stellen Sie Arbeitslösungen von Östron-Biotin: Avidin-HRP-Konjugat und Waschpuffer her. Nach Herstellung der Konjugat-Arbeitslösung ist es wichtig, dass sie gemischt und <u>mindestens 15 Minuten lang vor Verwendung stehengelassen wird.</u>
2.	Entnehmen Sie die benötigte Anzahl von Mikrotiterstreifen. Verschließen Sie den Beutel und legen alle nicht verwendeten Streifen wieder zurück in den Kühlschrank.
3.	Pipettieren Sie 50 µl jeder Standard, Kontrolle und Probe jeweils zweifach in entsprechend markierte Wells.
4.	Pipettieren Sie jeweils 100 µl der Konjugat-Arbeitslösung in jeden Well. (Wir empfehlen Verwendung einer Mehrkanalpipette.)
5.	1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler (\approx 200 UPM) inkubieren.
6.	Waschen Sie die Wells 3x mit vorbereitetem Waschpuffer (300 µl/Well für jeden Waschgang) und schlagen die Platte fest auf saugfähigem Papier aus, um sicherzustellen, dass sie trocken ist (Verwendung eines Waschautomaten wird empfohlen).
7.	Pipettieren Sie jeweils 150 µl TMB-Substrat in definierten Zeitintervallen in die Wells.
8.	Die Platte 10-15 Minuten lang auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur inkubieren. (oder bis Standard A dunkelblaue Farbe für gewünschte OD erreicht).
9.	Zu den gleichen Zeitintervallen wie in Schritt 7 je 50 µl Stopplösung in jeden Well pipettieren.
10.	Messen der Platte auf einem Mikrotiterplattenlesegerät bei 450 nm innerhalb von 20 Minuten nach der Zugabe der Stopplösung.
	Wenn die OD die obere Messgrenze überschreitet oder kein 450-nm-Filter verfügbar ist, kann ersatzweise ein 405- oder 415-nm-Filter eingesetzt werden. Die optischen Dichten sind damit niedriger, jedoch hat dies keine Auswirkungen auf die Ergebnisse der Patienten-/Kontrollproben.

BERECHNUNGEN

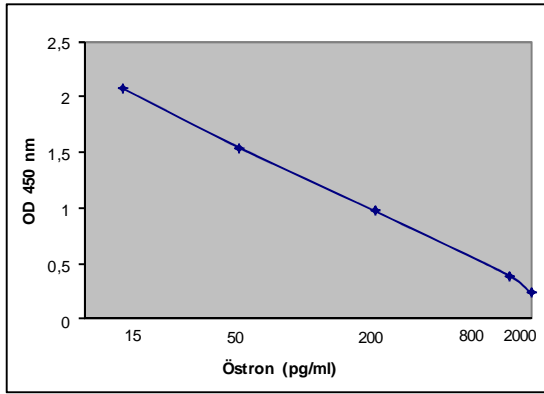
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes Standard-Duplikats.
- Zeichnen Sie auf halblogarithmischem Papier eine Standardkurve mit mittlerer optischer Dichten als Y-Achse und Standardkonzentration als X-Achse. Wenn Immunoassay-Software verwendet wird, wird eine 4- oder 5-Parameter-Kurve empfohlen.
- Berechnen Sie die mittlere optische Dichte jedes unbekanntes Duplikats.
- Lesen Sie die unbekanntes Werte direkt von der Standardkurve ab.
- Wenn eine Probe mit mehr als 2000 pg/ml gemessen wird, verdünnen Sie sie mit Standard A auf eine Verdünnung von nicht mehr als 1:8. Das erhaltene Ergebnis ist mit dem Verdünnungsfaktor zu multiplizieren.

TYPISCHE TABELLARISCHE DATEN

Standard	OD 1	OD 2	MW OD	Wert (pg/ml)
A	2,162	2,175	2,169	0
B	1,805	1,935	1,870	15
C	1,470	1,473	1,472	50
D	0,697	0,671	0,684	200
E	0,352	0,345	0,349	800
F	0,222	0,213	0,218	2000
Unbekannt	1,290	1,350	1,320	65

TYPISCHE STANDARDKURVE

Nur Beispielkurve. **Nicht** zur Ergebnisberechnung verwenden.



LEISTUNGSMERKMALE

EMPFINDLICHKEIT

Die untere Nachweisgrenze ergibt sich aus der Standardkurve durch die Bestimmung der resultierenden Konzentration der mittleren OD der Standard A (basierend auf 10 Analysen) minus 2σ . Daher beträgt die Empfindlichkeit des "Direct Estrone ELISA Kit" **10,0 pg/ml**.

SPEZIFITÄT (KREUZREAKTIVITÄT)

Die folgenden Verbindungen wurden mit dem "Direct Estrone ELISA Kit" auf Kreuzreaktivität getestet, wobei 100% die Kreuzreaktivität von Östron war.

Steroid	% Kreuzreaktivität
Östron	100
Östron-3-Sulfat	4,9
17 β -Östradiol	2,2
Östron-3-Glucuronid	1,2
17 β -Östradiol-3-Glucuronid	0,14

Die folgenden Steroide wurden getestet, aber zeigten weniger als 0,1% Kreuzreaktivität: Androstendion, Cholesterin, Corticosteron, Cortisol, Cortison, DHEAS, Diethylstilbesterone, Östriol, 17 β -Östradiol-3-Glucuronid, Östradiol-Sulfat, Progesteron, 17-OH-Progesteron und Testosteron.

REPRODUZIERBARKEIT INNERHALB EINES ASSAYS

Drei Proben wurden jeweils 10-mal mit der gleichen Standardkurve getestet. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	55,40	4,50	9,1
2	250,50	16,78	6,7
3	1563,57	112,78	7,2

REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN ASSAYS

Drei Proben wurden zehn Mal über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Mittelwert	StAbw	VK%
1	55,62	6,53	11,7
2	260,12	17,96	6,9
3	1478,63	145,63	9,9

WIEDERFINDUNG

Dotierte Proben wurden durch Zugabe von definierten Mengen von Östron zu drei Patientenserumproben hergestellt. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind im Folgenden dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1. Undotiert	52	-	-
+200	315	252	125
+400	557	452	120
+1000	1235	1052	117
2. Undotiert	75	-	-
+375	493	450	110
+750	505,23	559,81	90,3
+1500	712,44	794,88	89,6
3. Undotiert	720,11	-	-
+200	758,13	837,64	90,5
+400	856,46	955,17	89,7
+1000	1013,61	1190,24	85,1

LINEARITÄT

Drei Patientenserumproben wurden mit Standard A verdünnt. Die Ergebnisse (in pg/ml) sind nachfolgend tabellarisch dargestellt:

Probe	Beob. Resultat	Erw. Resultat	Wiederfindung (%)
1	340,67	-	-
1:2	165,35	170,34	97,1
1:4	95,39	85,17	112,0
1:8	48,47	42,58	113,8
2	1086,01	-	-
1:2	508,58	543,00	93,7
1:4	232,11	271,50	85,5
1:8	114,95	135,75	84,7
3	1313,21	-	-
1:2	612,98	656,61	93,4
1:4	318,63	328,30	97,1
1:8	134,98	164,15	82,2

VERGLEICHSTUDIEN

Das "Direct Estrone ELISA Kit" (y) wurde mit einem auf beschichteten Röhrchen basierenden RIA-Kits der Konkurrenz (x) verglichen. Der Vergleich von 29 Serumproben ergab die folgenden linearen Regressionsergebnisse:

$$y = 1,134x - 7,014$$
$$r^2 = 0,99$$

ERWARTETE STANDARDWERTE

Wie bei allen klinischen Tests sollte jedes Labor Daten sammeln und seinen eigenen Bereich erwarteter Standardwerte erstellen.







Gruppe	Bereich (pg/ml)
Männer	25-150
Frauen	25-350
Schwangerschaft	100-8000

LITERATUR

- Hauptmann. H. et al: Concepts for the synthesis of biotinylated steroids. Part 2: 17estradiol derivatives as immunochemical probes. Bioconjugate Chem. 11(2000) 537- 548
- Dressendorfer R.A. et al: Synthesis of a cortisol-biotin conjugate and evaluation as a tracer in an immunoassay for salivary cortisol measurement. J. Steroid Biochem. Molec. Biol.: 43 (1992) 683-692
- Mayer H.H.D. et al: Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 J. Steroid Biochem. 35 (1990) 263-269
- Folan J. et al: Solid-phase Enzymeimmunoassay of estrone in serum. Clin. Chem. 34(1988) 1843-1846
- Folan J. et al: Solid-Phase Enzymeimmunoassay of estrone in saliva. Clin. Chem. 35:4(1989)569-572
- Speroff L. et al: Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: Clinical gynecologic endocrinology & infertility, 3rd ed. Willanms & Wilkins. 1983: 1-41

- Kim M.H. et al: Plasma levels of estrogen, androgens and progesterone during normal and dexamethasone-treated cycles. J. Clin. Endocrinol. Metab.. 39(1974)706-712
- Speight A.C. et al; Non-protein bound oestrogens in plasma and urinary excretion of unconjugated oestrogens in non-pregnant women. J. Endocrino 83(1979) 385-391
- Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chemistry 45:7, 1999.
- Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

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