

PATHOZYME® OESTRADIOL Ref OD477

Immunoenzymatyczny test (EIA) do ilościowego oznaczenia estradiolu w surowicy lub osoczu.

Przechowywać w temp. 2°C - 8°C. NIE ZAMRAŻAĆ.

Do diagnostyki "in vitro".

WPROWADZENIE

Estradiol (E2) jest 18-węglowym ludzkim hormonem steroidowym zawierającym fenolowy pierścień "A". Ten steroidowy hormon ma ciężar cząsteczkowy 272,4 daltonów. Estradiol jest najsilniejszym, naturalnym estrogenem, produkowanym głównie przez jajniki, łożysko, a w mniejszej ilości przez korę nadnerczy i męskie jądra.^{2,3}

Estradiol jest wydzielany do obiegu krwi, gdzie 98% krąży w postaci związanej z globuliną wiążącą hormony płciowe (SHBG). Aby zmniejszyć ilość wolnego estradiolu cząsteczki hormonu są przyłączane do innych białek surowicy takich jak albuminy. Tylko niewielka frakcja krąży jako wolny hormon lub jako forma skoniugowana.^{4,5}

Aktywne oddziaływanie estrogenne odbywa się poprzez receptory estradiolowe, które wywołują odpowiednią reakcję na poziomie jądra w miejscu docelowym. Do tych miejsc należą pęcherzyki jajnika, macica, sutek, pochwa, cewka moczowa, podwzgórze, przysadka mózgowia i w mniejszym stopniu wątroba i skóra.

U kobiet nie będących w ciąży, z prawidłowym cyklem miesiączkowym, sekrecja estradiolu odbywa się cyklicznie, dwufazowo z najwyższym stężeniem obecnym tuż przed owulacją.^{6,7} Przyjmuje się, że wzrastające stężenie estradiolu wywołuje dodatkowe sprężenie zwrotne wykazujące działanie na poziomie przysadki mózkowej, gdzie wpływa na sekrecję gonadotropin, hormon folikularny (FSH) i hormon luteotropowy (LH), które są charakterystyczne odpowiednio dla dojrzewania pęcherzyka jajowego i owulacji.^{8,9} Tuż po owulacji, poziom estradiolu szybko spada, a komórki lutealne stają się aktywne, czego efektem jest wtórne, delikatne podniesienie i plato estradiolu w fazie lutealnej. W czasie ciąży, poziom estradiolu w surowicy ciężarnej znacząco wzrasta, dużo powyżej poziomu piku przedowulacyjnego i wysoki poziom utrzymuje się przez cały okres ciąży.¹⁰

Oznaczanie estradiolu w surowicy jest cennym wskaźnikiem w ocenie różnych zaburzeń miesiączkowania, takich jak przedwczesne i opóźnione dojrzewanie dziewczynki¹¹, pierwotny lub wtórny brak miesiączki czy menopauza.¹² Zaobserwowano wzrost poziomu estradiolu u pacjentów z objawami feminizacji¹⁴, ginekostatii¹⁵ i nowotworami jądra.¹⁶

W przypadkach niepłodności, oznaczanie estradiolu w surowicy jest wykorzystywane do monitorowania indukcji owulacji w efekcie zastosowanego leczenia takimi lekami jak: klomifen, hormon uwalniający LH (LH-RH) lub egzogenne gonadotropiny.^{17,18} Podczas hiperstimulacji jajników przy zapłodnieniu in vitro (IVF), monitorowanie stężenia estradiolu w surowicy prowadzone jest oddzielnie w celu uchwycenia optymalnego czasu podawania ludzkiej chorionogonadotropiny i nagromadzenie komórek jajowych.¹⁹

PRZEZNACZENIE

PATHOZYME OESTRADIOL (E2) jest testem, w którym wykorzystano metodę immunoenzymatyczną (EIA) do ilościowego oznaczenia estradiolu w ludzkiej surowicy lub osoczu. Do użytku w laboratorium.

ZASADA

PATHOZYME OESTRADIOL (E2) jest testem, w którym wykorzystano metodę kompetycyjnego łączenia się pomiędzy (E2) w badanej próbce i (E2)-HRP koniugatu ze stałą ilością króliczych przeciwciał anti-estradiolowych. W czasie inkubacji, kozie anty-królicze przeciwciała IgG opłaszczane na kubeczkach są inkubowane ze standardami, kontrolami i badanymi próbkami zawierającymi (E2), koniugatem HRP-E2 i odczynnikami zawierającym królicze przeciwciała anti-estradiolowe. W czasie inkubacji, określona ilość (E2) znakowanego peroksydazą chrzanową współzawodniczy z endogennym (E2) obecnym w standardach, badanych próbkach lub surowicach kontrolnych o miejsce wiążące na specyficznych przeciwciałach (E2).

W ten sposób, ilość (E2) znakowanego peroksydazą chrzanową, która może ulec przyłączeniu do kubeczka progresywnie spada jeżeli stężenie (E2) w badanej próbce wzrasta.

Nadmiar niezwiązanego (E2) znakowanego peroksydazą chrzanową (koniugatu) zostaje usunięty, a kubeczki poddane procesowi płukania. Dodanie substratu (TMB) inicjuje reakcję barwną, efektem czego jest pojawienie się niebieskiego koloru. Zatrzymanie reakcji następuje po dodaniu odczynnika zatrzymującego reakcję, a pomiar absorbancji dokonywany jest spektrofotometrycznie przy długości fali 450 nm. Intensywność zabarwienia jest proporcjonalna do ilości obecnego enzymu i odwrotnie zależna od ilości nieoznakowanego (E2) w badanej próbce.

Krzywą kalibracyjną uzyskuje się przez wykreślenie w układzie współrzędnych stężenia standardów w odniesieniu do ich absorbancji. Stężenie estradiolu w badanych próbkach i surowicach kontrolnych nastawionych równoległe ze standardami może być wyliczone z wykreślonej krzywej kalibracyjnej.

Test wykalibrowano względem wewnętrznego standardu. Nie ma międzynarodowego wzorca dla tego testu.

SKŁAD ZESTAWU

Ref
OD477



Microtitre Plate 12 x 8 wells x 1

Dzielną mikropłytkę z kubeczkami opłaszczonymi kozimi anty-króliczymi przeciwciałami w klasie IgG, umieszczoną w foliowej torebce ze środkiem pochłaniającym wilgoć.

Cal	A	0 pg / ml	0.5ml
-----	---	-----------	-------

Standard referencyjny: ludzka surowica pozbawiona estradiolu. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Cal	B	10 pg / ml	0.5ml
-----	---	------------	-------

Standard referencyjny: estradiol rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Cal	C	30 pg / ml	0.5ml
-----	---	------------	-------

Standard referencyjny: estradiol rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Cal	D	100 pg / ml	0.5ml
-----	---	-------------	-------

Standard referencyjny: estradiol rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Cal	E	300 pg / ml	0.5ml
-----	---	-------------	-------

Standard referencyjny: estradiol rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Cal	F	1000 pg / ml	0.5ml
-----	---	--------------	-------

Standard referencyjny: estradiol rozcieńczony w ludzkiej surowicy. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Control	1	Level as stated on vial	0.5ml
---------	---	-------------------------	-------

Surowica zawierająca rozpuszczony estradiol o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)

Control	2	Level as stated on vial	0.5ml
---------	---	-------------------------	-------

Surowica zawierająca rozpuszczony estradiol o znanym mianie. Gotowa do użycia. (Bezbarwna)

Ab	REAG	Oestradiol	7ml
----	------	------------	-----

Odczynnik zawierający królicze przeciwciała anti-estradiolowe. Gotowy do użycia. (Różowy)

Conj			11ml
------	--	--	------

Estradiol znakowany peroksydazą chrzanową. Gotowy do użycia. (Niebieski)

Subs	TMB		11ml
------	-----	--	------

Roztwór substratu: 3,3', 5,5' tetrametylobenzidyna w buforze octanowym. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Soln	Stop	HCl	1M	11ml
------	------	-----	----	------

Odczynnik zatrzymujący reakcję: kwas solny rozcieńczony w czystej wodzie. Gotowy do użycia. (Bezbarwny)

Instrukcja i druk protokołu. 1 + 1

MATERIAŁY WYMAGANE DO WYKONANIA OZNACZENIA, NIE ZAŁĄCZONE DO ZESTAWU

Pipety: 100µl, 200µl i 1000µl.
Końcówki do pipet.
Papier absorbacyjny.
Czytnik mikropłytek z filtrem 450 nm.
Papier milimetrový.
Dokładnie umyte szkło laboratoryjne.

ŚRODKI OSTROŻNOŚCI

Zestaw PATHOZYME OESTRADIOL zawiera materiał pochodzenia ludzkiego. Wykonano badania na obecność przeciwciał HCV, HIV 1 i 2 – wynik negatywny oraz HbsAg zgodnie z zatwierdzonymi przez FDA procedurami. Ponieważ żadne znane procedury nie dają całkowitej pewności, iż pozyskany materiał pochodzenia ludzkiego nie zawiera innych czynników zakaźnych, produkt należy traktować jako potencjalnie zakaźny i zaleca się obchodzić z nim ze szczególną ostrożnością i uwagą. Zaleca się również zachowanie środków ostrożności przy wykonywaniu oznaczenia traktując wszystkie odczynniki jako potencjalnie zakaźne. Nie spożywać.

Zestaw PATHOZYME OESTRADIOL nie zawiera substancji niebezpiecznych sklasyfikowanych przez aktualne, brytyjskie regulacje dotyczące substancji chemicznych. Jednakże zaleca się aby wszystkie odczynniki traktować jako potencjalny materiał niebezpieczny. Wszystkie zalecenia muszą być zgodne z lokalnymi rozporządzeniami.

Zestaw PATHOZYME OESTRADIOL zawiera rozcieńczony kwas solny jako odczynnik zatrzymujący reakcję – środek żrący. Używając z zachowaniem środków ostrożności. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą.

Odczynniki wchodzące w skład zestawu PATHOZYME OESTRADIOL zawierają 1% Proclin™ 300 jako konserwant, który może być środkiem toksycznym jeśli zostanie spożyty. W przypadku kontaktu spłukać obficie wodą i udać się po pomoc medyczną.

*Proclin™ 300 jest chroniony znakiem towarowym firmy ROHM & HAAS Limited.

PRZECHOWYWANIE

Odczynniki muszą być przechowywane w temperaturze 2°C - 8°C.

Test będzie spełniał standardy jakości podane w specyfikacji do końca daty ważności, która jest podana na zestawie i poszczególnych składnikach. Data ważności to ostatni dzień miesiąca podany na buteleczce i etykiecie zestawu. Nie używać odczynników przeterminowanych.

Nie poddawać odczynników działaniu zbyt wysokiej temperatury. Unikać wystawiania na bezpośrednie działanie światła słonecznego.

NIE ZAMRAŻAĆ ODCZYNNIKÓW – zamrożenie powoduje nieodwracalny rozkład.

PRZYGOTOWANIE I PRZECHOWYWANIE PRÓBK

Surowica: Pobrać próbkę krwi żyłnej, odstawić do wykrzepnięcia i oddzielenia surowicy. Odwirować wykrzepioną krew i odciągnąć surowicę. Zaleca się używać świeżej surowicy.

Osocze: Pobrać próbkę krwi żyłnej do próbki zawierającej EDTA. Odwirować próbkę i odciągnąć osocze. Zaleca się używać świeżego osocza.

Nie używać do badania próbek zhemolizowanych, mętnych lub lipemicznych, powyższe może fałszować wyniki.

Surowica lub osocze mogą być przechowywane do 48 godzin w temperaturze 2°C - 8°C. W przypadku dłuższego przechowywania, próbkę zamrozić w temp. - 20°C (możliwość przechowywania do 1 roku). Rozmrożoną próbkę wymieszać przed wykonaniem oznaczenia.

Nie używać azydki sodowej jako konserwantu, może hamować aktywność enzymu peroksydazy.

Unikać wielokrotnego zamrażania i rozmrażania próbek, powyższe może fałszować wyniki.

PRZYGOTOWANIE ODCZYNNIKÓW

Przed użyciem wszystkie odczynniki doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C) i delikatnie wymieszać. Unikać spienienia.

OGRANICZENIA

Test jest nieważny jeżeli do badania użyto innego materiału niż surowica lub osocze pobrane na EDTA. Żadna modyfikacja procedury nie jest dozwolona. Interpretacja uzyskanych wyników powinna być przeprowadzona w oparciu o wywiad lekarski. Diagnostyka nie może być oparta wyłącznie o jedno badanie kliniczne.

PROCEDURA

1. Przed wykonaniem oznaczenia wszystkie odczynniki i próbki badane doprowadzić do temperatury pokojowej (20°C - 25°C).
2. Do każdej serii badań należy nastawić nową krzywą kalibracyjną. Umieścić odpowiednią ilość kubeczków w ramce mikropłytki. Zanotować pozycje standardów i próbek badanych na druku protokołu załączonym do zestawu.
3. Nie używane kubeczki umieścić w szczelnie zamkniętej foliowej torebce ze środkami pochłaniającymi wilgoć i ponownie włożyć do lodówki (2°C - 8°C).
4. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 25µl standardów i próbek badanych.
5. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu koniugatu.
6. Do każdego kubeczka dodać po 50µl odczynnika zawierającego królicze przeciwciała anti-estradiolowe. Mieszać delikatnie przez 30 sekund. Ten punkt jest ważny dla procedury.
7. Inkubować 90 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Ręczne płukanie: Po zakończeniu inkubacji wylać zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Upewnić się czy w pojemniku na zlewki znajduje się odpowiedni środek odczynnika.
9. Napęlić kubeczki wodą destylowaną, do każdego kubeczka nalać minimum 300µl. Wytrząsnąć zawartość z kubeczków do pojemnika na odpady. Osuszyć kubeczki kładąc je do góry dnem na papierze absorbującym. Przemyczyć puste kubeczki 5-krotnie.
10. Energicznie uderzać kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku, tak aby usunąć resztki wody.
11. Płukanie przy użyciu płuczki automatycznej: upewnić się, że płuczka dozuje 300µl płynu na każdy kubeczek oraz czy do pojemnika na zlewki został dodany odpowiedni środek odczynnika. Przemyczyć puste kubeczki 5-krotnie wodą destylowaną. Po zakończeniu płukania usunąć resztki płynu poprzez energiczne uderzenie kubeczkami na papierze absorbującym lub papierowym ręczniku.
12. Do wszystkich kubeczków dodać po 100 µl roztworu substratu. Mieszać delikatnie przez 5 sekund.
13. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
14. Zatrzymać reakcję przez dodanie do każdego kubeczka po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję.
15. Delikatnie mieszać przez 30 sekund. Upewnić się, że barwa niebieska całkowicie uległa zmianie na barwę żółtą.
16. Natychmiast odczytać wartości absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) na czytniku mikropłytek przy długości fali 450 nm.

WYKRYWANIE I USUWANIE BŁĘDÓW

Test jest przeznaczony do użycia przez laboranta z minimum doświadczenia analitycznego.

Nie używać rozłożonych lub zanieczyszczonych odczynników.

Do pipetowania surowic używać jednorazowych końcówek w celu uniknięcia wzajemnego zanieczyszczenia próbek.

Zalecane jest nastawianie kalibratorów i próbek badanych w dubletach, chociaż nie koniecznie wymagane.

Próbki badane i kalibratory powinny być pipetowane z zachowaniem jednakowych warunków przeprowadzenia analizy.

Zaleca się nastawianie jednorazowo nie więcej niż 32 kubeczków w przypadku ręcznego pipetowania, pipetowanie standardów i próbek badanych powinno być zakończone w ciągu 3 minut. Nastawienie całej mikropłytki (96 kubeczków) jest możliwe w przypadku automatycznego pipetowania.

Po użyciu każdego odczynnika natychmiast zamknąć buteleczkę odpowiednią nakrętką.

Unikać wielokrotnego pipetowania (wielokrotnego otwierania) odczynników pobranych z magazynu – może to być przyczyną ich zanieczyszczenia.

Nie mieszać odczynników lub opłaczonych kubeczków mikropłytki z różnych zestawów. Zachować szczególną uwagę aby nie dotykać ścian kubeczków w trakcie ich rozdzielania.

Nie dopuścić aby odczynniki podczas pipetowania spływały po ściankach kubeczków. Przed wykonaniem oznaczenia przynieść wszystkie odczynniki do temperatury pokojowej (20°C - 25°C). Delikatnie wymieszać wszystkie odczynniki poprzez delikatne odwracanie lub obracanie.

Raz rozpoczęta procedura powinna być kontynuowana tak, aby podczas wykonywania oznaczenia kubeczki nie zostały wysuszone.

Nie zanieczyszczaj roztworu substratu, może to spowodować, że cały zestaw nie będzie aktywny.

Sprawdź precyzję i dokładność sprzętu laboratoryjnego używanego podczas procedury wykonania oznaczenia tak, aby być pewnym odtwarzalności wyników.

Nie używane paski, przed ponownym włożeniem do lodówki (temp. 2°C - 8°C), powinny być szczelnie zamknięte (zamknięcie typu zip-lock) w foliowej torebce ze środkami pochłaniającymi wilgoć

OBLICZANIE WYNIKÓW

Obliczyć średnią wartość absorbancji (A_{500}) dla każdego kalibratora i próbek badanych. Wykreślić krzywą kalibracyjną na papierze milimetrycznym odkładając na osi X: stężenia poszczególnych kalibratorów wyrażone w jednostkach pg/ml, a na osi Y: odpowiadające im wartości absorbancji. Z wykresu krzywej kalibracyjnej odczytać wartości estradiolu w pg/ml dla próbek badanych. Do odczytu użyć wyłącznie wartości średnie. Jeżeli wyniki kontroli lub znanych próbek badanych nie dają oczekiwanych wartości test należy uznać za nieważny.

Jeśli do obliczeń używamy aparatury z oprogramowaniem wówczas krzywą kalibracyjną obliczyć w oparciu o równanie poligonale z ekstrapolacją krzywej.

WARTOŚCI OCZEKIWANE I CZUŁOŚĆ

Uzyskana krzywa kalibracyjna powinna mieć kształt hiperboliczny odwrotnie proporcjonalny od uzyskanych wartości absorbancji w stosunku do odpowiednich wartości stężeń kalibratorów. Test można uznać za ważny jeżeli wartość absorbancji kalibratora A jest większa niż 1,5, a wartość absorbancji kalibratora F jest mniejsza niż 0,75.

Zalecane jest aby każde laboratorium ustaliło własne zakresy wartości prawidłowych w oparciu o daną populację pacjentów. Zakresy wartości prawidłowych testem **PATHOZYME OESTRADIOL** uzyskano w losowo wybranych surowicach pozyskanych z laboratoriów klinicznych działających w leczeniu otwartym.

Uzyskane wartości przedstawiono poniżej:

Mężczyźni:	Dorośli	<60 pg/ml
Kobiety:	Po menopauzie	<18 pg/ml
	Owulacja, wczesna faza folikularna	30-100 pg/ml
	Późna faza folikularna	100-400 pg/ml
	Faza lutealna	60-150 pg/ml
	Kobiety ciężarne, zdrowe	do 35,000pg/ml
	Dzieci przed okresem dojrzewania	<10 pg/ml

CZUŁOŚĆ

Minimalny wykrywany powyższym testem poziom estradiolu wynosi 1 pg/ml.

SPECYFICZNOŚĆ

Sprawdzono interferencję dla poniższych substancji. Wartości procentowe wskazują na interferencję w 50% przesunięcia w odniesieniu do estradiolu (E2).

Wyniki interferencji dla kilku endogennych farmaceutycznych steroidów przedstawiono w tabeli poniżej:

$$\text{Interferencja (\%)} = \frac{\text{wykryte stężenie estradiolu}}{\text{stężenie steroidu}} \times 100$$

Steroid	Interferencja
Estradiol	100%
Estron	2.10%
Estriol	1.50%
17a Estriol	0.30%
Kortyzol	<0.01%
Kortyzon	<0.01%
Progesteron	<0.01%
Testosteron	<0.01%
Siarczan DHEA	<0.01%
5a Dihydrotestosteron	<0.01%

OCENA WYNIKÓW

Test kalibrowano względem innych uznanych testów konkurencyjnych oraz względem wewnętrznych standardów.

Współczynnik zmienności testu **PATHOZYME OESTRADIOL** jest mniejszy lub równy 10%.

Do porównania testów Omega Pathozyne Oestradiol kit i DRG Oestradiol Kit użyto próbek o wartościach estradiolu pomiędzy 17 a 1351 pg/ml i uzyskano następujące wyniki.

Liczba próbek badanych	174
Współczynnik korelacji	0.98
Wartość nachylenia krzywej	1.05
Punkt przecięcia z osią OY	- 3.67
Wartość średnia testem Omega	367 pg/ml
Wartość średnia testem DRG	279 pg/ml

Testy wykazują dobrą korelację.

PIŚMIENNICTWO

- (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.* 51:1407-1411;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. p331-385. Raven Press, New York, 1988.
- (3) **Hall, P. F.** Testicular Steroid Synthesis: Organisation and Regulation. In: *The Physiology of Reproduction*, Ed. Knobil, E. and Neill, J. et al. p975-998. Raven Press, New York, 1982.
- (4) **Sitleri, P. K., Murai, J. T., Hammon, G.L., Nisker, J. A., Raymoure, E. J. and Kuhn, R. W.** The serum transport of steroid hormones. *Rec. Prog. Horm. Res.* 38:457-510;1988.
- (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.* 35:443-447;1981.
- (6) **Bard, 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. p125-133. Academic Press, New York, 1976.
- (7) **McNasty, 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 oestradiol-17B during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34:312-318;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.* 49:507-512;1979.
- (10) **Simpson, E. R. and McDonald, P.C.** Endocrinology of Pregnancy. In: *Textbook of Endocrinology*, Ed. Williams, R. H. p412-422. Saunders Company, Philadelphia, 1981.
- (11) **Jenner, M. R., Kelch, R. P. et al.** Hormonal changes in prepubertal children, pubertal females in precocious puberty, premature thelarche, hypergonadism 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: 348-354;1982.
- (13) **Kirschner, M. A.** The role of hormones in the etiology of human breast cancer. *Cancer.* 39:2716-2726;1977.
- (14) **Odell, W. D. and Swerdloff, R. D.** Abnormalities of gonadal function in men. *Clin. Endocrinol.* 8:149-180;1978.
- (15) **McDonald, P.C., Madden, J.C., Brenner, P.F., Wilson, J. D. and Sitleri, P. K.** Origin of oestrogen in normal men and women with testicular feminisation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 49:905;1979.
- (16) **Peckham, M. J. and McElwain, T. J.** Testicular tumours. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*
- (17) **Taubert, H. D. and Dericks-Tan, J. S. E.** Induction of ovulation by clomiphene citrate in combination with high doses of estrogens or nasal application of LH-RH. In: *Ovulation in the Human*. Eds. Crosignandi, P. G. and Mishell, D. R. p265-273. Academic Press, New York, 1976.
- (18) **Fishel, S. B., Edwards, R. G., Purdy, J. M., Steptoe, P.C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J., Fishly, C., Hewitt, J. and Rowland, G.** Implantation, abortion and birth after in-vitro stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin. *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer.* 1:24-28;1985.
- (19) **Wrambsy, H., Sundstrom, 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 estradiol and progesterone as sole index. *Human Reproduction.* 2:235-238;1987.
- (20) **Ratcliffe, 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.
- (22) **USA Centre for Disease Control/National Institute of Health Manual.** **Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories**, 1984.

SKRÓCONA WERSJA WYKONANIA OZNACZENIA

1. Do odpowiednich kubeczków odpipetować po 25µl standardów, próbek badanych i surowic kontrolnych.
2. Do każdego kubeczka dodać po 100µl HRP koniugatu.
3. Do każdego kubeczka dodać po 50µl króliczych przeciwciał anti-estradiolowych. Delikatnie mieszać przez 30 sekund.
4. Inkubować 90 minut w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
5. Wylać zawartość z kubeczków i przepłukać 5-krotnie wodą destylowaną.
6. Do każdego kubeczka dodać po 100µl roztworu substratu i delikatnie mieszać przez 5 sekund.
7. Inkubować 20 minut w ciemnym miejscu w temperaturze pokojowej (20°C - 25°C).
8. Do każdego kubeczka dodać po 100µl odczynnika zatrzymującego reakcję i delikatnie mieszać przez 30 sekund.
9. Natychmiast odczytać wartość absorbancji (w czasie nie dłuższym niż 10 minut) przy użyciu czytnika płytek przy długości fali 450 nm.

8097 ISSUE 4 Revised July 2010

© Omega Diagnostics Ltd., 2010. POLISH.



OMEGA DIAGNOSTICS LTD
Omega House, Hillfoots Business Village
Alva, FK12 5DQ, Scotland, United Kingdom
odl@omegadiagnostics.co.uk
www.omegadiagnostics.com
AN ISO 9001 & 13485 CERTIFIED COMPANY