



DCM003-14

Ed. 02/2024

ESTRADIOL ELISA

per analisi di routine

Determinazione immunoenzimatica diretta del 17 β -estradiolo nel siero o plasma umano

IVD

LOT

Vedere l'etichetta esterna

2°C  8°C $\Sigma = 96$ test

REF DKO003

1. DESTINAZIONE D'USO

Per uso diagnostico *in vitro*

Per uso professionale in laboratorio

Estradiol ELISA è un dispositivo diagnostico manuale *in vitro* per la determinazione quantitativa del 17 β -estradiolo nel siero o nel plasma umano da una popolazione adulta.

2. RILEVANZA CLINICA

L'estradiolo (noto anche come 17 β -estradiolo, estradiolo o E2) è uno dei tre principali estrogeni prodotti nel corpo umano. Gli altri due sono l'estrone (E1) e l'estriolo (E3), prodotti soprattutto nelle donne rispettivamente in post-menopausa e durante la gravidanza. L'estradiolo è l'estrogeno predominante sintetizzato nelle donne in pre-menopausa e svolge un ruolo fondamentale nella regolazione della fertilità femminile.

L'estradiolo viene sintetizzato nelle ghiandole surrenali, nelle ovaie (donne) e nei testicoli (uomini). Viene prodotto dalla conversione del testosterone, che diventa estradiolo grazie all'azione dell'enzima 'aromatasi'. L'enzima aromatasi è inoltre responsabile della produzione di estrone attraverso la conversione dell'androstenedione¹.

Gli estrogeni regolano lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari; l'estradiolo è però coinvolto anche in altre funzioni fisiologiche che hanno luogo in diversi organi e apparati, come la pelle, i vasi sanguigni, le ossa, i muscoli, il tratto gastrointestinale, il cervello, i polmoni, il pancreas², ecc. La quantificazione degli estrogeni (e degli androgeni) è utile per valutare e gestire diversi disturbi legati agli ormoni sessuali, tra cui ipogonadismo, irsutismo, amenorrea, disturbi della fertilità e tumori ovarici.

Data la rilevanza dell'estradiolo nella regolazione del ciclo mestruale, bassi livelli di questo ormone sono associati a disturbi del ciclo e amenorrea. È quindi possibile utilizzarne i valori per valutare la funzionalità ovarica e supportare la diagnosi di recupero della funzione ovarica nelle donne trattate con inibitori dell'aromatasi³.

Negli uomini i livelli di estradiolo sono notoriamente bassi e la sua funzione biologica non è chiaramente compresa. Vi sono indizi del suo coinvolgimento in diverse condizioni fisiologiche e patologiche, come il cancro alla prostata

e l'infertilità. Se invece se ne riscontrano livelli elevati negli uomini, dovuti all'elevata attività dell'aromatasi, si ha un'inibizione della sintesi dell'ormone luteinizzante da parte dell'ipofisi, che determina una diminuzione del testosterone e l'insorgenza di ipogonadismo e ginecomastia.

L'estradiolo ha un ruolo chiave nell'omeostasi ossea: bassi livelli sono associati alla perdita di massa ossea. L'ormone influenza infatti l'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti, supportando il mantenimento dell'omeostasi ossea, ed è considerato un buon fattore predittivo per quanto riguarda la massa ossea^{1,2,4-6}.

3. PRINCIPIO DEL METODO

Il test Estradiol ELISA è un dosaggio immunometrico enzimatico competitivo (ELISA) in cui il 17 β -estradiolo (antigene) presente nel campione compete con il 17 β -estradiolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP) per legarsi al numero limitato di anticorpi anti-17 β -estradiolo con cui è rivestita la micropiastra (fase solida).

Dopo l'incubazione, si esegue la separazione libero-legato con un semplice lavaggio della fase solida. Quindi, l'enzima HRP nella parte libera reagisce con il substrato (H₂O₂) e il substrato TMB e sviluppa un colore blu che cambia in giallo quando viene aggiunta la soluzione di arresto (H₂SO₄). L'intensità del colore è inversamente proporzionale alla concentrazione di 17 β -estradiolo nel campione.

La concentrazione di 17 β -estradiolo nel campione viene calcolata attraverso una curva di calibrazione.

4. REAGENTI, MATERIALI E STRUMENTAZIONE

4.1. Reagenti e materiali forniti nel kit

1. Calibratori (6 flaconi, 0,5 mL ciascuno)

Siero umano, ProClin > 0,0015%, NaN₃ <0,1% e BSA

CAL0

CAL1

CAL2

CAL3

CAL4

CAL5

REF DCE002/0306-0

REF DCE002/0307-0

REF DCE002/0308-0

REF DCE002/0309-0

REF DCE002/0310-0

REF DCE002/0311-0

2. Controllo (1 flacone, 0,5 mL)

Siero umano, ProClin > 0,0015%, NaN_3 <0,1% e BSA

La concentrazione del controllo è indicata sul Certificato di analisi **REF DCE045/0303-0**

3. Coniugato (1 flacone, 22 mL)

17 β -estradiolo coniugato con perossidasi di rafano (HRP), ProClin <0,0015% e BSA **REF DCE002/0302-0**

4. Micropiastro rivestita (1 micropiastro frangibile)

Anticorpi anti-17 β -estradiolo adsorbiti su micropiastro **REF DCE002/0303-0**

5. Substrato TMB (1 flacone, 15 mL)

H_2O_2 -TMB 0,26 g/L (evitare qualsiasi contatto con la pelle) ProClin <0,0015% **REF DCE004-0**

6. Soluzione di arresto (1 flacone, 15 mL)

Acido solforico 0,15 M (evitare qualsiasi contatto con la pelle) **REF DCE005-0**

7. Soluzione di lavaggio conc. 10X (1 flacone, 50 mL)

Tampone fosfato 0,2 M, pH 7,4. ProClin >0,0015% **REF DCE054-0**

4.2. Materiali richiesti ma non forniti

Acqua distillata

4.3. Materiali e strumentazione ausiliari

Erogatore automatico

Pipette di precisione

Lettore di micropiastre (450 nm, 620-630 nm)

5. AVVERTENZE

- Questo kit è destinato all'uso *in vitro* esclusivamente da parte di professionisti. Non per uso interno o esterno in esseri umani o animali.
- Utilizzare adeguati dispositivi di protezione individuale mentre si lavora con i reagenti forniti.
- Seguire le buone prassi di laboratorio (GLP, Good Laboratory Practice) per la manipolazione di emoderivati.
-  Tutto il materiale di origine umana utilizzato nella preparazione dei reagenti è stato testato e risultato negativo per gli anticorpi dell'HIV 1 e 2, HbsAg e HCV. Nessun metodo di prova, tuttavia, può offrire la completa garanzia che HIV, HBV, HCV o altri agenti infettivi siano assenti. Pertanto, i calibratori e i controlli devono essere manipolati allo stesso modo del materiale potenzialmente infettivo.
-  Il materiale di origine animale utilizzato nella preparazione del kit è stato ottenuto da animali certificati come sani e la proteina bovina è stata ottenuta da Paesi non infettati dalla BSE, ma tali materiali devono essere trattati come potenzialmente infettivi.
- Alcuni reagenti (calibratori, controllo e soluzione di lavaggio) contengono piccole quantità di ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) come conservante. Evitare il contatto con pelle o mucose.
- Classificazione secondo il regolamento (CE) n. 1272/2008 [CLP]
Sensibilizzazione cutanea, categoria 1



Attenzione

Contiene: ProClin 300

Indicazioni di pericolo:

H317 - Può provocare una reazione allergica cutanea.

Consigli di prudenza:

P261 - Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.

P280 - Indossare guanti/indumenti protettivi/proteggere gli occhi/proteggere il viso/proteggere l'udito.

P321 - Trattamento specifico (vedere istruzioni supplementari di pronto soccorso su questa etichetta).

P333+P313 - In caso di irritazione o eruzione della pelle: Consultare un medico.

P362+P364 - Togliere tutti gli indumenti contaminati e lavarli prima di indossarli nuovamente.

- Alcuni reagenti (calibratori e controllo) contengono piccole quantità di azoturo di sodio (NaN_3) <0,1% come conservante. L'azoturo di sodio può essere tossico se ingerito o assorbito attraverso la pelle o gli occhi; inoltre, può reagire con le tubature di piombo o rame formando azoturi metallici potenzialmente esplosivi. Se si utilizza un lavandino per rimuovere i reagenti, lavare con abbondante acqua per evitare l'accumulo di azoturi.
- Il substrato TMB contiene un irritante, che può essere dannoso se inalato, ingerito o assorbito per via cutanea. Per prevenire lesioni, evitare l'inalazione, l'ingestione o il contatto con pelle e occhi.
- La soluzione di arresto consiste in una soluzione diluita di acido solforico. L'acido solforico è velenoso e corrosivo e può essere tossico se ingerito. Per prevenire ustioni chimiche, evitare il contatto con pelle e occhi.
- Evitare l'esposizione del reagente TMB/ H_2O_2 a luce solare diretta, metalli o ossidanti. Non congelare la soluzione.

6. PRECAUZIONI

- Attenersi rigorosamente alla sequenza dei passaggi di pipettaggio forniti in questo protocollo. I dati sulle prestazioni qui rappresentati sono stati ottenuti utilizzando i reagenti specifici elencati in queste istruzioni per l'uso.
- Tutti i reagenti devono essere conservati refrigerati a 2-8 °C nel contenitore originale. Tutte le eccezioni sono chiaramente indicate.
- Lasciare che tutti i componenti del kit e i campioni raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) e mescolare bene prima dell'uso.
- Non scambiare i componenti di kit di lotti diversi. La data di scadenza stampata sulle etichette della confezione e delle fiale deve essere rispettata. Non utilizzare alcun componente del kit dopo la data di scadenza.
- Se si utilizzano apparecchiature automatizzate, l'utente ha la responsabilità di assicurarsi che il kit sia stato adeguatamente convalidato per il suo utilizzo/scopo previsto.
- La rimozione incompleta o imprecisa del liquido dai pozzetti potrebbe influenzare la precisione del dosaggio e/o aumentare il background. Per migliorare le prestazioni del kit sui sistemi automatici, si raccomanda di aumentare il numero di lavaggi.
- È importante che il tempo di reazione in ogni pozzetto sia mantenuto costante per ottenere risultati riproducibili. Il pipettaggio dei campioni non deve andare oltre i dieci minuti per evitare deviazioni del

dosaggio. Se sono necessari più di 10 minuti, seguire lo stesso ordine di erogazione. Se si utilizza più di una piastra, si raccomanda di ripetere la curva dose-risposta in ogni piastra.

- L'aggiunta della soluzione di substrato TMB avvia una reazione cinetica, che viene terminata dall'aggiunta della soluzione di arresto. Pertanto, il substrato TMB e la soluzione di arresto devono essere aggiunti nella stessa sequenza per eliminare qualsiasi deviazione temporale durante la reazione.
- Osservare le linee guida per l'esecuzione del controllo di qualità nei laboratori medici analizzando i controlli e/o i sieri in pool.
- La massima precisione è richiesta per la ricostituzione e l'erogazione dei reagenti.
- I campioni microbiologicamente contaminati, altamente lipemici, **itterici** o emolizzati non devono essere utilizzati nel dosaggio.
- I lettori di piastre misurano verticalmente. Non toccare il fondo dei pozzetti.
- Quando si pipettano i reagenti del dosaggio, compresi campioni, calibratori e controlli, è necessario utilizzare puntali monouso nuovi per ridurre il rischio di contaminazione da carryover. In caso contrario, i risultati potrebbero non essere validi.

7. CONSERVAZIONE E STABILITÀ DEI REAGENTI

Conservare il kit a 2-8 °C, al buio.

- Il kit è stabile a 2-8 °C fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta esterna del kit.
- Una volta aperto, il kit è stabile a 2-8 °C per 6 mesi.
- La soluzione di lavaggio diluita è stabile per 30 giorni a 2-8 °C.

Nota importante: aprire il sacchetto contenente la micropiastra rivestita solo quando è a temperatura ambiente e chiuderlo immediatamente dopo l'uso.

8. RACCOLTA E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Il dosaggio deve essere eseguito utilizzando campioni di siero (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o di plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Conservazione dei campioni	Durata
2-8 °C	24 ore
Cicli di congelamento/scongelamento	1 ciclo

9. PROCEDURA

9.1. Preparazione di calibratori e controlli

I calibratori sono pronti per l'uso e hanno le seguenti concentrazioni di 17 β -estradiolo:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

I calibratori sono pronti per l'uso; la concentrazione di ogni calibratore è stampata sull'etichetta.

Il controllo è pronto per l'uso.

9.2. Preparazione del coniugato

Il coniugato è pronto per l'uso. Miscelare delicatamente per 5 minuti in un agitatore rotante.

9.3. Preparazione della soluzione di lavaggio

Diluire il contenuto della fiala "Soluzione di lavaggio conc. 10X" con acqua distillata fino a un volume finale di 500 mL prima dell'uso. Per i volumi più piccoli, rispettare il rapporto di diluizione 1:10.

È possibile osservare la presenza di cristalli all'interno della soluzione di lavaggio concentrata; in tal caso, mescolare a temperatura ambiente fino alla completa dissoluzione dei cristalli. Per una maggiore precisione, diluire l'intero flacone di soluzione di lavaggio concentrata a 500 mL, avendo cura anche di trasferire completamente i cristalli sciacquando il flacone, quindi mescolare fino a quando i cristalli non si dissolvono completamente.

9.4. Preparazione dei campioni

La determinazione del 17 β -estradiolo può essere effettuata nel siero umano (provette di campionamento standard o provette contenenti gel per la separazione del siero) o nel plasma (litio eparina, sodio eparina o EDTA di potassio).

Non sono necessari campioni a digiuno e non sono richieste preparazioni speciali dei campioni.

Raccogliere il sangue mediante puntura venosa in contenitori vacutainer e separare il siero (dopo la formazione del coagulo) o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione. Non è raccomandata l'analisi di campioni inattivati al calore.

Conservare il campione a -20 °C se la determinazione non viene eseguita lo stesso giorno della raccolta del campione. Evitare di congelare e scongelare ripetutamente i campioni. Prima dell'uso, miscelare delicatamente per 5 minuti con un agitatore rotante.

9.5. Procedura

- **Lasciare che tutti i reagenti raggiungano la temperatura ambiente (22-28 °C) per almeno 30 minuti.** Alla fine del dosaggio, conservare immediatamente i reagenti a 2-8 °C: evitare una lunga esposizione a temperatura ambiente.
- Le strisce di micropozzetti rivestiti non utilizzate devono essere rilasciate in modo sicuro nella busta di alluminio contenente l'essiccante e conservate a 2-8 °C.
- Per evitare potenziali contaminazioni microbiche e/o chimiche, i reagenti inutilizzati non devono mai essere trasferiti nelle fiale originali.
- Poiché è necessario eseguire la determinazione in duplicato per migliorare la precisione dei risultati della prova, preparare due pozzetti per ogni punto della curva di calibrazione (C₀-C₅), due per ogni controllo, due per ogni campione, uno per il bianco.

Reagente	Calibratore	Campione/ Controllo	Bianco
Calibratore Co-C ₅	25 µL		
Campione/ Controllo		25 µL	
Coniugato	200 µL	200 µL	

Incubare 2 ore a +37 °C.

Rimuovere il contenuto da ogni pozzetto, lavare i pozzetti tre volte con 300 µL di soluzione di lavaggio diluita.

Nota importante: durante ogni fase di lavaggio, agitare delicatamente la piastra per 5 secondi e rimuovere la soluzione in eccesso picchiettando la piastra capovolta su una salvietta di carta assorbente.

Lavatore automatico: se si utilizzano apparecchiature automatiche, lavare i pozzetti almeno 5 volte.

Substrato TMB	100 µL	100 µL	100 µL
---------------	--------	--------	--------

Incubare a temperatura ambiente (22-28 °C) per 30 minuti al buio.

Soluzione di arresto	100 µL	100 µL	100 µL
-------------------------	--------	--------	--------

Agitare delicatamente la micropiastra.

Leggere l'assorbanza (E) a 450 nm tramite il confronto con una lunghezza d'onda di riferimento di 620-630 nm o con il bianco entro 5 minuti.

10. CONTROLLO QUALITÀ

Le buone prassi di laboratorio (GLP) richiedono l'inclusione di campioni per il controllo della qualità in ogni serie di dosaggi al fine di verificare le prestazioni del dosaggio. I controlli devono essere trattati come campioni sconosciuti e i risultati devono essere analizzati con metodi statistici appropriati.

Il controllo fornito nel kit deve essere testato come se fosse sconosciuto e ha lo scopo di agevolare la valutazione della validità dei risultati ottenuti in ogni piastra di dosaggio.

La concentrazione media di ciascun livello di controllo è documentata nel rapporto del controllo di qualità incluso in ciascun kit. Tali livelli di concentrazione media sono determinati in base a diversi dosaggi eseguiti in duplicato in più posizioni su ciascuna piastra.

DiaMetra raccomanda agli utenti di conservare le annotazioni grafiche dei valori di controllo generati con ciascun dosaggio, tra cui medie mobili, DS e % CV. Queste informazioni faciliteranno l'analisi delle tendenze dei controlli per quanto riguarda le prestazioni dei lotti di controllo attuali e pregressi rispetto ai dati forniti nel controllo di qualità. Le tendenze aiuteranno a identificare i dosaggi che generano valori di controllo significativamente diversi dal rispettivo intervallo medio.

Quando si interpretano i dati dei controlli, occorre tenere conto del fatto che il prodotto è stato progettato e sviluppato come prodotto per l'utilizzo manuale. L'intervallo riportato sul

certificato del controllo di qualità deve essere appropriato per i dosaggi eseguiti manualmente e rispettando rigorosamente la procedura di dosaggio descritta sopra. Gli esperti del controllo di qualità riconoscono che, a causa delle differenze di condizioni e di prassi, si avrà sempre una variabilità nei valori medi e nella precisione delle misurazioni dei controlli eseguite da laboratori diversi⁷.

11. CALCOLO DEI RISULTATI

Sono disponibili vari pacchetti software di elaborazione dei dati, che possono essere utilizzati per generare la curva di calibrazione media e per calcolare le concentrazioni medie di campioni e controlli sconosciuti. **È consigliato** un adattamento della curva logistica a 4 parametri (4PL) **che includa il calibratore 0**.

In alternativa, è possibile preparare una curva di calibrazione su carta millimetrata semilogaritmica tracciando un grafico con l'assorbanza media sull'asse delle ordinate e la concentrazione dell'analita sull'asse delle ascisse. Nella curva di calibrazione deve essere incluso il calibratore 0. Leggere il valore medio dell'assorbanza di ciascun campione sconosciuto dalla curva.

Affinché i risultati del dosaggio siano considerati validi, i calibratori e i controlli del kit devono rientrare nelle specifiche riportate nel certificato di analisi specifico del lotto.

In caso contrario, i risultati dei test associati non saranno validi e i campioni dovranno essere analizzati nuovamente.

Conversione delle unità

Per convertire i risultati in unità SI:

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

12. INTERVALLO DI MISURAZIONE

L'intervallo di misurazione del dosaggio (AMR) è 29,6 – 2000 pg/mL (108,7 – 7342 pmol/L).

Tutti i valori inferiori a 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L) devono essere refertati come "< 29,6 pg/mL (108,7 pmol/L)". Tutti i valori superiori a 2000 pg/mL (7342 pmol/L) devono essere refertati come "> 2000 pg/mL (7342 pmol/L)".

13. METROLOGIA E TRACCIABILITÀ

I calibratori di questo kit sono tracciabili allo standard di riferimento per l'estradiolo dell'Istituto Nazionale di Metrologia del Giappone (6004-a).

14. VALORI ATTESI

I seguenti intervalli sono stati determinati utilizzando il test Estradiol ELISA e sono forniti unicamente a scopo informativo. L'intervallo di riferimento del 90% per adulti apparentemente sani è stato calcolato con un metodo non parametrico secondo le linee guida tratte dal documento CLSI C28-A3 "Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory".

Adulti	n	Mediana (pg/mL)	Intervallo di riferimento (pg/mL)
Maschi	120	34,3	<29,6 – 64,2
Femmine			
Fase luteinica	40	71,6	<29,6 – 212,4
Fase follicolare	39	46,5	<29,6 – 135,6
Fase ovulatoria	41	57,1	<29,6 – 273,5
Donne	120	32,9	<29,6 – 65,8
Gravidanza			
1° trimestre	40	1120,1	301,2 – >2000
2° trimestre	39	>2000	1850,3 – >2000
3° trimestre	40	>2000	>2000

Bambini	n	Mediana (pg/mL)	Intervallo di riferimento (pg/mL)
Femmine			
1-10 anni	39	56,7	<29,6 – 115,1
10-15 anni	41	79,8	46,9 – 155,5
15-19 anni	40	138,3	88,8 – 264,1
Maschi			
1-10 anni	40	58,5	<29,6 – 115,7
10-15 anni	39	39,2	<29,6 – 105,1
15-19 anni	39	31,7	<29,6 – 91,3

Gli intervalli sopraindicati devono essere considerati solo come linee guida; si raccomanda a ogni laboratorio di stabilire i propri intervalli di valori attesi sulla base della propria popolazione di pazienti.

15. CARATTERISTICHE DI AZIONE

Sono mostrati i dati più rappresentativi delle prestazioni. I risultati ottenuti nei singoli laboratori possono variare.

15.1. Capacità di rilevamento

Il limite del bianco (LoB), il limite di rilevamento (LoD) e il limite della determinazione quantitativa (LoQ) sono stati definiti basandosi sulla procedura CLSI EP17-A, “Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation” utilizzando 6 bianchi e 6 campioni a basso livello.

Sensibilità	Concentrazione
Limite del bianco (LoB)	6,8 pg/mL
Limite di rilevamento (LoD)	14,6 pg/mL
Limite della determinazione quantitativa (LoQ)	29,6 pg/mL

15.2. Esattezza

L'esattezza è stata dimostrata attraverso un test di recupero per il test Estradiol ELISA con lo standard di riferimento per l'estradiolo dell'Istituto Nazionale di Metrologia del Giappone (codice 6004-a).

15.3. Precisione

La precisione del test Estradiol ELISA è stata determinata eseguendo un complesso studio di precisione.

Ripetibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I dati di un lotto rappresentativo sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	Intra-test (ripetibilità)	
			DS	% CV
1	75	51,7	6,1	11,9%
2	75	134,2	11,3	8,4%
3	75	264,0	25,4	9,6%
4	75	627,7	56,4	9,0%
5	75	838,1	61,5	7,3%
6	75	1346,6	120,2	8,9%

Riproducibilità: un totale di 6 campioni di siero è stato analizzato in 5 repliche, una volta al giorno per 5 giorni da 3 operatori.

I risultati per i dati combinati di 2 lotti sono mostrati di seguito:

Campione	n	Conc. media (pg/mL)	All'interno del laboratorio (riproducibilità)	
			DS	% CV
1	150	52,4	8,2	15,7%
2	150	139,0	21,2	15,3%
3	150	274,7	39,0	14,2%
4	150	633,9	66,0	10,4%
5	150	860,0	95,3	11,1%
6	150	1374,7	159,8	11,6%

15.4. Linearità

La linearità è stata valutata secondo le linee guida basate su CLSI EP-06, “Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures”. Per quanto riguarda la concentrazione di estradiolo determinata mediante il test Estradiol ELISA, la procedura di misurazione evidenzia un comportamento lineare nell'intervallo tra 16,5 e 2271,3 pg/mL (tra 60,57 e 8337,9 pmol/L) entro la deviazione ammissibile di linearità (ADL) di ±15%.

15.5. Confronto del metodo

Il test Estradiol ELISA è stato confrontato con un dosaggio quantitativo disponibile in commercio, come indicato nel documento CLSI EP-09C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". Con ogni metodo è stato valutato un totale di 106 campioni, selezionati per rappresentare un ampio intervallo di concentrazioni di estradiolo. Sui dati comparativi è stata eseguita l'analisi di regressione di Passing-Bablok con i seguenti risultati:

n	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
106	0,98 [0,93 – 1,04]	14,5 [8,6 – 18,2]	0,99

15.6. Specificità analitica

La specificità è stata valutata con i seguenti reagenti crociati.

Reagente crociato	Concentrazione testata	Reattività crociata % media
Estriolo	100 ng/mL	1,0%
Estrone	100 ng/mL	0,9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0,4%
Testosterone	100 ng/mL	0,0%
Cortisolo	1000 ng/mL	0,0%
Progesterone	200 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0,0%
17OH progesterone	100 ng/mL	0,0%
5 α-diidrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0,0%
Androstenedione	100 ng/mL	0,0%
Androsterone	100 ng/mL	0,0%
Cortisone	1000 ng/mL	0,0%
Prednisolone	200 ng/mL	0,0%
Danazolo	1000 ng/mL	0,0%
2-metossiestradiolo	10 ng/mL	0,7%
17α-etinilestradiolo	200 ng/mL	0,0%
17β-estradiolo-17- solfato	100 ng/mL	0,0%

Le seguenti sostanze non interferiscono generando una distorsione > ±15% nel dosaggio Estradiol ELISA quando le concentrazioni sono inferiori alla soglia dichiarata riportata nella tabella seguente.

Reagente potenzialmente interferente	Concentrazione di soglia
Bilirubina, coniugata	3.89 mg/dL
Bilirubina, non coniugata	20 mg/dL
Emoglobina	640 mg/dL
Proteine totali	8.3 g/dL
Trigliceridi	2000 mg/dL

15.7. Studio su siero-plasma

È stato condotto uno studio di confronto tra matrici del test Estradiol ELISA per valutare la differenza tra i tipi di provette (provette per la separazione del siero (SST), per plasma in litio eparina, per plasma in sodio eparina e plasma in K2 EDTA) rispetto ai campioni di controllo (siero tappo rosso, senza additivo) secondo le linee guida CLSI EP35. Sono stati utilizzati in totale 22 campioni (18 nativi, 4 nativi arricchiti) per coprire l'intervallo. L'analisi di regressione di Passing-Bablok è stata effettuata sui dati comparativi:

Tipo di campione	Pendenza [IC 95%]	Intercetta (pg/mL) [IC 95%]	Coefficiente di correlazione (r)
SST	1,03 [0,98 - 1,07]	-3,5 [-37,2 - 30,2]	1,00
Litio eparina	1,04 [0,97 - 1,12]	-0,8 [-59,0 - 57,4]	0,99
Sodio eparina	1,10 [1,03 - 1,17]	-8,05 [-62,2 - 46,1]	0,99
EDTA	1,06 [1,01 - 1,11]	-7,6 [-46,3 - 31,1]	0,99

16. LIMITAZIONI D'USO

- Come nel caso di qualsiasi procedura diagnostica, i risultati devono essere interpretati unitamente ai dati clinici del paziente e alle altre informazioni a disposizione del medico.
- Gli anticorpi eterofili nel siero umano possono reagire con le immunoglobuline dei reagenti, interferendo con gli immunodosaggi *in vitro*⁸. I pazienti regolarmente esposti agli animali o a prodotti derivati da siero animale possono essere soggetti a questa interferenza, quindi si potrebbero osservare valori anomali.

17. GESTIONE DEI RIFIUTI

I reagenti devono essere smaltiti in conformità alle normative locali.

Tutti i materiali che sono entrati in contatto con i campioni e i reagenti devono essere smaltiti in conformità con le normative nazionali, regionali e locali.

18. BIBLIOGRAFIA

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

19. IDENTIFICATORE DELLE REVISIONI

Le aggiunte o le modifiche alle istruzioni per l'uso sono indicate dall'evidenziazione in grigio.

20. RECLAMI SUI PRODOTTI E SUPPORTO TECNICO

Per un paziente/utente/terza parte nell'Unione Europea e nei Paesi con un regime normativo simile (Regolamento 2017/746/UE relativo ai dispositivi medico-diagnostici *in vitro*); se, durante l'uso di questo dispositivo o come risultato del suo utilizzo, si è verificato un incidente grave, segnalarlo al produttore e/o al suo rappresentante autorizzato e all'autorità normativa nazionale.

Il produttore può essere contattato tramite il relativo servizio clienti o il team di supporto tecnico. I dettagli di contatto sono disponibili di seguito e sul sito Web dell'azienda: www.diametra.com.

Ed. 02/2024

DCM003-14



DCM003-14

Ed. 02/2024

ESTRADIOL ELISA

for routine analysis

Immunoenzymatic determination of 17 β -Estradiol in human serum or plasma

IVD

LOT

See external label

2°C  8°C Σ = 96 tests

REF DKO003

1. INTENDED PURPOSE

For *In Vitro* Diagnostic Use
For Laboratory Professional Use

Estradiol ELISA is a manual *in vitro* diagnostic device intended for the quantitative determination of 17 β -Estradiol in human serum or plasma from an adult population.

2. CLINICAL SIGNIFICANCE

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

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

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

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

Estradiol levels are known to be low in men where its biological function is not clearly understood. There is some indication that it is involved in several physiological and pathological conditions such as prostate cancer and

infertility. Conversely, elevated levels in men, due to high activity of aromatase, inhibits the synthesis of luteinising hormone from the pituitary gland leading to a decrease in testosterone and onset of hypogonadism and gynaecomastia.

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

3. PRINCIPLE OF THE METHOD

The Estradiol ELISA is a competitive enzyme immunometric assay (ELISA) where 17 β -Estradiol (antigen) in the sample competes with the antigenic 17 β -Estradiol conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for binding to the limited number of antibodies anti 17 β -Estradiol coated on the microplate (solid phase).

After the incubation, the bound/free separation is performed by a simple solid phase washing. Then, the enzyme HRP in the bound fraction reacts with the Substrate (H₂O₂) and the TMB Substrate and develops a blue colour that changes into yellow when the Stop Solution (H₂SO₄) is added. The colour intensity is inversely proportional to the 17 β -Estradiol concentration in the sample.

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

4. REAGENTS, MATERIALS AND INSTRUMENTATION

4.1. Reagents and materials supplied in the kit

1. Calibrators (6 vials, 0.5 mL each)

Human serum, ProClin >0.0015%, NaN₃ <0.1% and BSA

CAL0	REF DCE002/0306-0
CAL1	REF DCE002/0307-0
CAL2	REF DCE002/0308-0
CAL3	REF DCE002/0309-0
CAL4	REF DCE002/0310-0
CAL5	REF DCE002/0311-0

2. Control (1 vial, 0.5 mL)

Human serum, ProClin >0.0015%, NaN₃ <0.1% and BSA

Concentration of Control is indicated on the Certificate of Analysis

REF DCE045/0303-0

3. Conjugate (1 vial, 22 mL)
17 β -Estradiol conjugated with horseradish peroxidase (HRP). ProClin <0.0015% and BSA
REF DCE002/0302-0
4. Coated Microplate (1 microplate breakable)
Anti 17 β -Estradiol antibodies adsorbed on microplate
REF DCE002/0303-0
5. TMB Substrate (1 vial, 15 mL)
H₂O₂-TMB (0.26 g/L) (*avoid any skin contact*)
ProClin <0.0015%
REF DCE004-0
6. Stop Solution (1 vial, 15 mL)
Sulphuric acid 0.15M (*avoid any skin contact*)
REF DCE005-0
7. 10X Conc. Wash Solution (1 vial, 50 mL)
Phosphate buffer 0.2M pH 7.4. Contains ProClin >0.0015%
REF DCE054-0

4.2. Materials required but not provided

Distilled water

4.3. Auxiliary materials and instrumentation

Automatic dispenser
Precision Pipetting Devices
Microplate reader (450 nm, 620-630 nm)

5. WARNINGS

- This kit is intended for *in vitro* use by professional persons only. Not for internal or external use in Humans or Animals.
- Use appropriate personal protective equipment while working with the reagents provided.
- Follow Good Laboratory Practice (GLP) for handling blood products.
-  All human source material used in the preparation of the reagents has been tested and found negative for antibody to HIV 1&2, HbsAg, and HCV. No test method however can offer complete assurance that HIV, HBV, HCV or other infectious agents are absent. Therefore, the Calibrators and the Controls should be handled in the same manner as potentially infectious material.
-  Material of animal origin used in the preparation of the kit has been obtained from animals certified as healthy and the bovine protein has been obtained from countries not infected by BSE, but these materials should be handled as potentially infectious.
- Some reagents (calibrators, control and wash solution) contain small amounts of ProClin™ 300 (>0.0015%, <0.06%) as preservative. Avoid contact with skin or mucosa.
- Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]
Skin sensitivity, Category 1



Warning

Contains: ProClin 300

Hazard statements:

H317 - May cause an allergic skin reaction.

Precautionary statements:

P261 - Avoid breathing dust/fume/gas/mist/vapours/spray.
P280 - Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/face protection/hearing protection.
P321 - Specific treatment (see supplemental first aid instruction on this label).
P333+P313 - If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention.
P362+P364 - Take off contaminated clothing and wash it before reuse.

- Some reagents (calibrators and control) contain small amounts of Sodium Azide (NaN₃) <0.1% as preservative. Sodium Azide may be toxic if ingested or absorbed through the skin or eyes; moreover, it may react with lead or copper plumbing to form potentially explosive metal azides. If you use a sink to remove the reagents, wash through large with amounts of water to prevent azide build-up.
- The TMB Substrate contains an irritant, which harmful if inhaled, ingested or absorbed through the skin. To prevent injury, avoid inhalation, ingestion or contact with skin and eyes.
- The Stop Solution consists of a diluted sulphuric acid solution. Sulphuric acid is poisonous, corrosive and can be toxic if ingested. To prevent chemical burns, avoid contact with skin and eyes.
- Avoid the exposure of reagent TMB/H₂O₂ to direct sunlight, metals or oxidants. Do not freeze the solution.

6. PRECAUTIONS

- Please adhere strictly to the sequence of pipetting steps provided in this protocol. The performance data represented here were obtained using specific reagents listed in this Instruction For Use.
- All reagents should be stored refrigerated at 2-8°C in their original container. Any exceptions are clearly indicated.
- Allow all kit components and specimens to reach room temperature (22-28°C) and mix well prior to use.
- Do not interchange kit components from different lots. The expiry date printed on box and vials labels must be observed. Do not use any kit component beyond their expiry date.
- If you use automated equipment, the user has the responsibility to make sure that the kit has been appropriately validated for its intended use/purpose.
- The incomplete or inaccurate liquid removal from the wells could influence the assay precision and/or increase the background. To improve the performance of the kit on automatic systems is recommended to increase the number of washes.
- It is important that the time of reaction in each well is held constant for reproducible results. Pipetting of samples should not extend beyond ten minutes to avoid assay drift. If more than 10 minutes are needed, follow the same order of dispensation. If more than one plate is used, it is recommended to repeat the dose response curve in each plate.
- Addition of the TMB Substrate solution initiates a kinetic reaction, which is terminated by the addition of the Stop Solution. Therefore, the TMB Substrate and the Stop Solution should be added in the same sequence to eliminate any time deviation during the reaction.

- Observe the guidelines for performing quality control in medical laboratories by assaying controls and/or pooled sera.
- Maximum precision is required for reconstitution and dispensation of the reagents.
- Samples microbiologically contaminated, highly lipemic, icteric or haemolysed should not be used in the assay.
- Plate readers measure vertically. Do not touch the bottom of the wells.
- Fresh disposable tips must be used when pipetting assay reagents including samples, calibrators and controls to mitigate the risk of carryover contamination. Failure to do so may lead to invalid results.

7. REAGENT STORAGE AND STABILITY

Store the kit at 2 – 8°C in the dark.

- The kit is stable at 2 – 8°C until the expiry date stated on the external kit label.
- Once opened, the kit is stable at 2 – 8°C for 6 months.
- The diluted wash solution is stable for 30 days at 2-8°C.

Important note: open the bag containing the Coated Microplate only when it is at room temperature and close it immediately after use.

8. SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

The assay should be performed using serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Sample Storage	Duration
2 – 8 °C	24 hours
Freeze/thaw cycles	1 cycle

9. PROCEDURE

9.1. Preparation of Calibrators and Controls

The Calibrators are ready to use and have the following concentration of 17β-Estradiol:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

The calibrators are ready to use; the concentration of the Calibrator is printed on the label.

The control is ready to use.

9.2. Preparation of the Conjugate

The conjugate is ready to use. Mix gently for 5 minutes with a rotating mixer.

9.3. Preparation of the Wash Solution

Dilute the content of the vial "10X Conc. Wash Solution" with distilled water to a final volume of 500 mL prior to use. For smaller volumes respect the 1:10 dilution ratio.

It is possible to observe the presence of crystals within the concentrated wash solution; in this case mix at room temperature until the complete dissolution of crystals. For greater accuracy, dilute the whole bottle of concentrated wash solution to 500 mL, taking care also to transfer crystals

completely by rinsing of the bottle, then mix until crystals are completely dissolved.

9.4. Preparation of Samples

The determination of 17β-Estradiol can be performed in human serum (standard sampling tubes or tubes containing serum separating gel) or plasma (lithium heparin, sodium heparin or potassium EDTA) samples.

Fasting samples are not necessary and no special sample preparations are required.

Collect blood by venepuncture into vacutainers and separate serum (after clot formation) or plasma from the cells by centrifugation. Testing of heat-inactivated sera is not recommended.

Store the sample at -20°C if the determination is not performed on the same day of the sample collection. Avoid repetitive freezing and thawing of samples. Before using, mix gently for 5 minutes with a rotating mixer.

9.5. Procedure

- **Allow all reagents to reach room temperature (22-28°C) for at least 30 minutes.** At the end of the assay, immediately store the reagents at 2-8°C: avoiding long exposure to room temperature.
- Unused coated microwell strips should be released securely in the foil pouch containing desiccant and stored at 2-8°C.
- To avoid potential microbial and/or chemical contamination, unused reagents should never be transferred into the original vials.
- As it is necessary to perform the determination in duplicate in order to improve accuracy of the test results, prepare two wells for each point of the calibration curve (C₀-C₅), two for each Control, two for each sample, one for Blank.

Reagent	Calibrator	Sample/ Control	Blank
Calibrator C ₀ -C ₅	25 µL		
Sample/ Control		25 µL	
Conjugate	200 µL	200 µL	

Incubate 2 h at +37°C.

Remove the contents from each well, wash the wells three times with 300 µL of diluted wash solution.

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

Automatic washer: if you use automated equipment, wash the wells at least 5 times.

TMB Substrate	100 µL	100 µL	100 µL
Incubate at room temperature (22÷28°C) for 30 minutes in the dark.			
Stop Solution	100 µL	100 µL	100 µL

Shake gently the microplate.
Read the absorbance (E) at 450 nm against a reference wavelength of 620-630 nm or against Blank within 5 minutes.

10. QUALITY CONTROL

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

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

The mean concentration of each control level is documented in the QC report included with each kit. These mean concentration levels are determined over several assays which are run in duplicate in multiple locations across each plate.

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

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

11. CALCULATION OF RESULTS

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

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

In order for the assay results to be considered valid the kit calibrators and control must fall within the specifications detailed in the lot specific certificate of analysis.

If a control is out of its specified range, the associated test results are invalid and samples must be retested.

Conversion of units

To convert results to SI units:
 $\text{pmol/L} = \text{pg/mL} \times 3.671$

12. MEASURING RANGE

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

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

13. METROLOGY AND TRACEABILITY

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

14. EXPECTED VALUES

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

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

Children	n	Median (pg/mL)	Reference interval (pg/mL)
Females			
1 – 10 years	39	56.7	<29.6 – 115.1
10 – 15 years	41	79.8	46.9 – 155.5
15 – 19 years	40	138.3	88.8 – 264.1
Males			
1 – 10 years	40	58.5	<29.6 – 115.7
10 – 15 years	39	39.2	<29.6 – 105.1
15 – 19 years	39	31.7	<29.6 – 91.3

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

15. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

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

15.1. Detection Capability

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

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

15.2. Trueness

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

15.3. Precision

Precision of the Estradiol ELISA was determined by performing a complex precision study.

Repeatability: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Data from one representative lot is shown below:

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

Reproducibility: A total of 6 serum samples were assayed in 5 replicates, once a day for 5 days by 3 operators.

Results for the combined data from 2 lots is shown below:

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

15.4. Linearity

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

15.5. Method comparison

The Estradiol ELISA was compared against a commercially available quantitative manual assay, following CLSI EP-09C, "Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples". A total of 106 samples, selected to represent a wide range of estradiol concentrations, was assayed by each method. Passing-Bablok regression analysis was performed on the comparative data:

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

15.6. Analytical Specificity

The specificity was assessed with the following cross-reactants.

Cross reactant	Concentration tested	Mean % Cross reactivity
Estradiol	100 ng/mL	1.0%
Estrone	100 ng/mL	0.9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0.4%
Testosterone	100 ng/mL	0.0%
Cortisol	1000 ng/mL	0.0%
Progesterone	200 ng/mL	0.0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0.0%
17OH Progesterone	100 ng/mL	0.0%
5 α -dihydrotestosterone (DHT)	500 ng/mL	0.0%
Androstenedione	100 ng/mL	0.0%
Androsterone	100 ng/mL	0.0%
Cortisone	1000 ng/mL	0.0%
Prednisolone	200 ng/mL	0.0%
Danazol	1000 ng/mL	0.0%
2-Methoxyestradiol	10 ng/mL	0.7%
17 α -Ethinylestradiol	200 ng/mL	0.0%
17 β -Estradiol17-sulphate	100 ng/mL	0.0%

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

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

15.7. Serum-plasma study

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

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

16. LIMITATIONS OF USE

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

17. WASTE MANAGEMENT

Reagents must be disposed of in accordance with local regulations.

All materials that have come into contact with samples and reagents must be disposed of in accordance with country, state and local regulations.

18. BIBLIOGRAPHY

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

19. REVISION IDENTIFIER

Additions or changes to the IFU are indicated by grey highlighting.

20. PRODUCT COMPLAINTS AND TECHNICAL SUPPORT

For a patient/user/third party in the European Union and in countries with similar regulatory regime (Regulation 2017/746/EU on IVD Medical Devices); if, during the use of this device or as a result of its use, a serious incident has occurred, please report it to the manufacturer and/or its authorised representative and to your national regulatory authority.

The manufacturer can be contacted through their customer service or technical support team. The contact details can be found below and on the company website: www.diametra.com.

Ed. 02/2024

DCM003-14



DCM003-14

Ed. 02/2024

ESTRADIOL ELISA

para el análisis de rutina

Determinación inmunoenzimática directa del 17 β -estradiol en suero o plasma humano

IVD

LOT

Ver etiqueta externa

2°C 8°C

 $\Sigma = 96$ pruebas

REF DKO003

1. FINALIDAD PREVISTA

Para uso en diagnóstico *in vitro*

Para uso profesional de laboratorio

Estradiol ELISA es un dispositivo manual de diagnóstico *in vitro* destinado a la determinación cuantitativa del 17 β -estradiol en suero o plasma humano de una población adulta.

2. IMPORTANCIA CLÍNICA

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

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

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

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

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

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

3. PRINCIPIO DEL MÉTODO

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

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

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

4. REACTIVOS, MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN

4.1. Reactivos y materiales incluidos en el kit

1. Calibradores (6 viales, 0,5 mL cada uno)

Suero humano, ProClin >0,0015%, NaN_3 <0.1% y BSA

CAL0 **REF** DCE002/0306-0

CAL1 **REF** DCE002/0307-0

CAL2 **REF** DCE002/0308-0

CAL3 **REF** DCE002/0309-0

CAL4 **REF** DCE002/0310-0

CAL5 **REF** DCE002/0311-0

2. Control (1 vial, 0,5 mL)

Suero humano, ProClin >0,0015%, NaN_3 <0.1% y BSA

La concentración de control se indica en el certificado de análisis **REF** DCE045/0303-0

3. Conjugado (1 vial, 22 mL)

17 β -estradiol conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), ProClin <0,0015% y BSA **REF** DCE002/0302-0

4. Microplaca recubierta (1 microplaca que se puede romper)

Anticuerpo de anti17 β -estradiol absorbido en microplaca **REF** DCE002/0303-0

5. Sustrato de TMB (1 vial, 15 mL)

H_2O_2 -TMB (0,26 g/L) (evitar el contacto con la piel) ProClin <0,0015% **REF** DCE004-0

6. Solución de detención (1 vial, 15 mL)

Ácido sulfúrico 0,15 M (evitar el contacto con la piel) **REF** DCE005-0

7. Conc. 10X Solución de lavado (1 vial, 50 mL)

Tampón fosfato 0,2 M pH 7,4. Proclin >0,0015% **REF** DCE054-0

4.2. Materiales necesarios, pero no suministrados

Agua destilada

4.3. Materiales auxiliares e instrumentación

Dispensador automático

Dispositivos de pipetas de precisión

Lector de microplacas (450 nm, 620-630 nm)

5. ADVERTENCIAS

- Este kit está destinado al uso *in vitro* realizado exclusivamente por profesionales. No es para uso interno o externo en personas ni animales.
- Utilice el equipo de protección personal adecuado cuando trabaje con los reactivos suministrados.
- Siga las prácticas de laboratorio recomendadas (BPL) para manipular productos sanguíneos.

-  Todo el material de origen humano utilizado en la preparación de los reactivos ha sido sometido a pruebas que han dado resultado negativo para los anticuerpos contra el VIH-1 y VIH-2, el HbsAg y el VHC. Sin embargo, ningún método de prueba puede ofrecer una garantía total de ausencia de VIH, VHB, VHC u otros agentes infecciosos. Por lo tanto, los calibradores y los controles deben manejarse de la misma manera que el material potencialmente infeccioso.

-  El material de origen animal utilizado en la preparación del kit se ha obtenido de animales certificados como sanos y la proteína bovina se ha obtenido de países donde no hay infección de EEB, pero

estos materiales deben manejarse como potencialmente infecciosos.

- Algunos reactivos (calibradores, control y solución de lavado) contienen pequeñas cantidades de ProClin™ 300 (>0,0015%, <0,06%) como conservante. Evite el contacto con la piel o las mucosas.

- Clasificación según Reglamento (UE) n° 1272/2008 [CLP]

Sensibilización cutánea, categoría 1



Contiene: ProClin 300

Atención

Indicaciones de peligro:

H317 - Puede provocar una reacción alérgica en la piel.

Consejos de prudencia:

P261 - Evitar respirar el polvo/el humo/el gas/la niebla/los vapores/el aerosol.

P280 - Llevar guantes/ropa de protección/equipo de protección para los ojos/la cara/los oídos.

P321 - Se necesita un tratamiento específico (ver instrucciones de primeros auxilios en esta etiqueta).

P333+P313 - En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico.

P362+P364 - Quitar las prendas contaminadas y lavarlas antes de volver a usarlas.

- Algunos reactivos (calibradores, control) contienen pequeñas cantidades de azida sódica (NaN_3) <0,1% como conservante. La azida sódica puede ser tóxica si se ingiere o se absorbe a través de la piel o los ojos; además, puede reaccionar con las tuberías de plomo o cobre para formar azidas metálicas potencialmente explosivas.

Si elimina los reactivos en un fregadero, lávelos con gran cantidad de agua para evitar la acumulación de azida.

- El sustrato de TMB contiene un irritante que es perjudicial si se inhala, se ingiere o se absorbe a través de la piel. Para evitar lesiones, evite la inhalación, la ingestión o el contacto con la piel y los ojos.
- La solución de detención consiste en una solución diluida de ácido sulfúrico. El ácido sulfúrico es venenoso, corrosivo y puede ser tóxico si se ingiere. Para evitar quemaduras químicas, evite el contacto con la piel y los ojos.
- Evite la exposición del reactivo TMB/ H_2O_2 a la luz solar directa, a metales o a oxidantes. No congele la solución.

6. PRECAUCIONES

- Siga estrictamente la secuencia de pasos de pipeteado que se indica en este protocolo. Los datos de rendimiento representados en este documento se obtuvieron utilizando los reactivos específicos indicados en estas instrucciones de uso.
- Todos los reactivos deben conservarse refrigerados entre 2 y 8 °C en su envase original. Las excepciones se indican claramente.
- Deje que todos los componentes del kit y las muestras alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) y mezcle bien antes de usarlos.
- No intercambie componentes del kit procedentes de diferentes lotes. Debe respetarse la fecha de caducidad impresa en las etiquetas de la caja y de los viales.

No utilice ningún componente del kit después de su fecha de caducidad.

- Si el usuario utiliza un equipo automatizado, tiene la responsabilidad de asegurarse de que el kit ha sido debidamente **validado para su uso previsto**.
- La eliminación incompleta o imprecisa del líquido de los pocillos podría alterar la precisión del ensayo o aumentar el fondo. Para mejorar el rendimiento del kit en sistemas automáticos se recomienda aumentar el número de lavados.
- Es importante que el tiempo de reacción en cada pocillo se mantenga constante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debe prolongarse más de diez minutos para evitar errores en el ensayo. Si se necesitan más de 10 minutos, siga el mismo orden de dispensación. Si se utiliza más de una placa, se recomienda repetir la curva dosis-respuesta en cada placa.
- La adición de la solución de sustrato de TMB inicia una reacción cinética, que finaliza al añadir la solución de detención. Por lo tanto, el sustrato de TMB y la solución de detención deben añadirse en la misma secuencia para eliminar las posibles desviaciones temporales durante la reacción.
- Respete las directrices para realizar el control de calidad en los laboratorios médicos mediante el ensayo de controles o sueros combinados.
- Se requiere la máxima precisión en la reconstitución y dispensación de los reactivos.
- No se deben usar en el ensayo muestras contaminadas microbiológicamente, muy lipémicas, **ictéricas** o hemolizadas.
- Los lectores de placas miden en vertical. No toque el fondo de los pocillos.
- Deben emplearse puntas desechables nuevas al pipetear reactivos de ensayo, incluidas las muestras, los calibradores y los controles, para mitigar el riesgo de contaminación por arrastre. De lo contrario, los resultados podrían no ser válidos.

7. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD DE LOS REACTIVOS

Almacene el kit a 2-8 °C en un lugar oscuro.

- El kit es estable a 2-8 °C hasta la fecha de caducidad indicada en su etiqueta externa.
- Una vez abierto, el kit es estable a 2-8 °C durante 6 meses.
- La solución de lavado diluida es estable durante 30 días a 2-8 °C.

Nota importante: abra la bolsa que contiene la microplaca recubierta solo cuando esté a temperatura ambiente y ciérrela inmediatamente después de su uso.

8. RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

El ensayo debe llevarse a cabo usando muestras de suero (tubos de muestras estándar o tubos que contienen gel para la separación de suero) o plasma (heparina de litio, heparina sódica o EDTA de potasio).

Almacenamiento de muestras	Duración
2-8 °C	24 horas
Ciclos de congelación/descongelación	1 ciclo

9. PROCEDIMIENTO

9.1. Preparación de calibradores y controles

Los calibradores están listos para utilizarse y tienen la siguiente concentración de 17:

	C ₀	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅
pg/mL	0	20	120	300	600	2000

Los calibradores están listos para su uso; la concentración del calibrador está impresa en la etiqueta.

El control está listo para su uso.

9.2. Preparación del conjugado

El conjugado está listo para su uso. Mezclar suavemente durante 5 minutos con un mezclador de rodillos.

9.3. Preparación de la solución de lavado

Diluir el contenido del vial «10X Conc. Wash Solution» con agua destilada hasta un volumen final de 500 mL antes de usarlo. Para volúmenes más pequeños, respete la relación de dilución de 1:10.

Es posible que observe la presencia de cristales dentro de la solución de lavado concentrada; en este caso, mezcle a temperatura ambiente hasta la completa disolución de los cristales. Para una mayor precisión, diluya todo el frasco de solución de lavado concentrada a 500 mL, teniendo cuidado también de transferir los cristales enjuagando completamente el frasco y luego mezclando hasta que los cristales se disuelvan completamente.

9.4. Preparación de las muestras

La determinación del 17β-Estradiol puede realizarse en suero humano (tubos de muestras estándar o tubos que contengan gel separador de suero) o plasma (heparina de litio, sodio heparina o EDTA de potasio).

Las muestras en ayunas no son necesarias ni se requieren preparaciones especiales de las muestras.

Recoja la sangre mediante venopunción en vacutainers y separe el suero (después de la formación del coágulo) o el plasma de las células mediante centrifugación. No se recomienda el análisis de muestras de suero o plasma inactivadas por calor.

Almacene la muestra a -20 °C si la determinación no se realiza el mismo día de la recogida de la muestra. Evite la congelación y descongelación repetida de las muestras. Antes de utilizar, mezclar suavemente durante 5 minutos con una batidora giratoria.

9.5. Procedimiento

- **Deje que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (22-28 °C) durante al menos 30 minutos.** Al finalizar el ensayo, almacene inmediatamente los reactivos a 2-8 °C: evite la exposición prolongada a la temperatura ambiente.
- Las tiras de micropocillos recubiertas no utilizadas deben dejarse de forma segura en el envoltorio de papel de aluminio que contiene desecante y almacenarse a 2-8 °C.
- Para evitar que se produzca una posible contaminación microbiana o química, los reactivos no utilizados nunca se deberán transferir a los viales originales.
- Como es necesario realizar la determinación por duplicado para mejorar la precisión de los resultados de la prueba, prepare dos pocillos para cada punto de la curva de calibración (C₀-C₅), dos por cada control, dos para cada muestra y uno para el blanco.

Reactivo	Calibrador	Muestra/ Control	Blanco
Calibrador C ₀ -C ₅	25 µL		
Muestra/ Control		25 µL	
Conjugado	200 µL	200 µL	

Incubar 2 h a +37 °C.

Retire el contenido de cada pocillo, lave los pocillos tres veces con 300 µL de solución de lavado diluida.

Nota importante: en cada paso de lavado, agite ligeramente la placa durante 5 segundos y elimine el exceso de solución golpeando la placa invertida sobre un paño de papel absorbente.

Lavadora automática: si utiliza un equipo automático, lave los pocillos al menos 5 veces.

Sustrato de TMB	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------	--------	--------	--------

Incubar a temperatura ambiente (22÷28 °C) durante 30 minutos en la oscuridad.

Solución de detención	100 µL	100 µL	100 µL
--------------------------	--------	--------	--------

Agite suavemente la microplaca.

Compare la absorbancia (E) a 450 nm con la obtenida con una longitud de onda de referencia de 620-630 nm o con el blanco en un plazo de 5 minutos.

10. CONTROL DE CALIDAD

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

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

La concentración media de cada nivel de control se documenta en el informe de control de calidad que se incluye en cada kit. Los niveles de concentración media se determinan respecto de varios análisis, los cuales se realizan por duplicado en varios puntos diferentes de cada placa.

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

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

11. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

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

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

Para que los resultados del ensayo se consideren válidos, los calibradores y el control del kit deben ajustarse a las especificaciones detalladas en el certificado de análisis específico del lote.

Si un control está fuera de su rango especificado, los resultados de la prueba asociados no son válidos y se deben volver a realizar pruebas de las muestras.

Conversión de unidades

Para convertir los resultados a unidades del SI:

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

12. RANGO DE MEDICIÓN

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

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

Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, usando 6 blancos y 6 muestras de bajo nivel.

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

15.2. Veracidad

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

15.3. Precisión

La precisión de Estradiol ELISA se determinó mediante la realización de un estudio de precisión complejo.

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

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

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

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

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

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

13. METROLOGÍA Y TRAZABILIDAD

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

14. VALORES ESPERADOS

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

Adultos	n	Mediana (pg/mL)	Intervalo de referencia (pg/mL)
Hombres	120	34,3	<29,6 – 64,2
Mujeres			
Fase luteínica	40	71,6	<29,6 – 212,4
Fase folicular	39	46,5	<29,6 – 135,6
Fase ovulatoria	41	57,1	<29,6 – 273,5
Posmenopáusicas	120	32,9	<29,6 – 65,8
Embarazo			
1. trimestre	40	1120,1	301,2 – >2000
2. trimestre	39	>2000	1850,3 – >2000
3. trimestre	40	>2000	>2000

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

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

15. CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

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

15.1. Capacidad de detección

El límite de blanco (LoB), el límite de detección (LoD) y el límite de cuantificación (LoQ) se determinaron con orientación del documento CLSI EP17-A, "Protocols for

15.4. Linealidad

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

15.5. Comparación de métodos

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

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

15.6. Especificidad analítica

La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados. La especificidad se evaluó con los siguientes reaccionantes cruzados.

Reaccionante cruzado	Concentración analizada	Promedio en % de reactividad cruzada
Estriol	100 ng/mL	1,0%
Estrona	100 ng/mL	0,9%
Fulvestrant	100 ng/mL	0,4%
Testosterona	100 ng/mL	0,0%
Cortisol	1000 ng/mL	0,0%
Progesterona	200 ng/mL	0,0%
DHEA-S	10000 ng/mL	0,0%
17OH-progesterona	100 ng/mL	0,0%
5 α -dihidrotestosterona (DHT)	500 ng/mL	0,0%
Androstenediona	100 ng/mL	0,0%
Androsterona	100 ng/mL	0,0%
Cortisona	1000 ng/mL	0,0%
Prednisolona	200 ng/mL	0,0%
Danazol	1000 ng/mL	0,0%
2-metoxiestradiol	10 ng/mL	0,7%

17 α -etinilestradiol	200 ng/mL	0,0%
17 β -estradiol-17-sulfato	100 ng/mL	0,0%

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

Reactivos que pueden interferir	Límite máximo de concentración
Bilirrubina, conjugada	3.89 mg/dL
Bilirrubina, no conjugada	20 mg/dL
Hemoglobina	640 mg/dL
Proteína total	8.3 g/dL
Triglicéridos	2000 mg/dL

15.7. Estudio en suero-plasma

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

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

16. LÍMITES DE USO

- Como en cualquier procedimiento diagnóstico, los resultados se deberán interpretar junto con los hallazgos clínicos del paciente y otra información de la que el médico disponga.
- Los anticuerpos heterofílicos en el suero humano pueden presentar reacciones con las inmunoglobulinas reactivas, que interfieren con los inmunoensayos *in vitro*⁸. Los pacientes que se exponen habitualmente a animales o a productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y puede que se observen valores anómalos.

17. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa local.

Todos los materiales que hayan entrado en contacto con las muestras y los reactivos deben eliminarse de acuerdo con la normativa nacional, estatal y local.

18. BIBLIOGRAFÍA

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

7. Basic QC Practices On-line Course; <http://www.Westgard.com>.
8. Boscato, LM. and Stuart, MC., 'Heterophilic antibodies: a problem for all immunoassays'. *Clin Chem*, 34, 1988, pp 27-33

19. IDENTIFICADOR DE REVISIÓN

Las adiciones o cambios en las instrucciones de uso se han resaltado en gris.

20. RECLAMACIONES SOBRE PRODUCTOS Y ASISTENCIA TÉCNICA

Para un paciente/usuario/tercero en la Unión Europea y en países con un régimen regulatorio similar: Reglamento (UE) 2017/746 sobre los productos sanitarios para diagnóstico in vitro; si, durante el uso de este dispositivo o como resultado de su uso, se ha producido un incidente grave, informe del mismo al fabricante o a su representante autorizado y al organismo regulador nacional. Puede contactar con el fabricante a través del servicio de atención al cliente o del equipo de asistencia técnica. Los datos de contacto se encuentran a continuación y en el sitio web de la empresa: www.diametra.com.

Ed. 02/2024

DCM003-14

	DE ES FR EN IT PT	<i>In vitro</i> Diagnostikum Producto sanitario para diagnóstico <i>In vitro</i> Dispositif medical de diagnostic <i>in vitro</i> <i>In vitro</i> Diagnostic Medical Device Dispositivo medico-diagnostico <i>in vitro</i> Dispositivos medicos de diagnostico <i>in vitro</i>		DE ES FR EN IT PT	Hergestellt von Elaborado por Fabriqué par Manufacturer Produttore Produzido por
	DE ES FR EN IT PT	Achtung, Begleitdokumente Precaución, consulte los documentos adjuntos Attention, veuillez consulter les documents d'accompagnement Caution, consult accompanying documents Attenzione, consultare la documentazione allegata Atenção, consultar os documentos de acompanhamento	 yyyy-mm	DE ES FR EN IT PT	Herstellungs datum Fecha de fabricacion Date de fabrication Date of manufacture Data di produzione Data de produção
 yyyy-mm-dd	DE ES FR EN IT PT	Verwendbar bis Estable hasta (usar antes de último día del mes) Utiliser avant (dernier jour du mois indiqué) Use by (last day of the month) Utilizzare prima del (ultimo giorno del mese) Utilizar (antes ultimo día do mês)		DE ES FR EN IT PT	Biogefährdung Riesco biológico Risque biologique Biological risk Rischio biologico Risco biológico
	DE ES FR EN IT PT	Gebrauchsanweisung beachten Consultar las instrucciones Consulter le mode d'emploi Consult instructions for use Consultare le istruzioni per l'uso Consultar instruções para uso		DE ES FR EN IT PT	Chargenbezeichnung Codigo de lote Numero de lot Batch code Codice del lotto Codigo do lote
 $\Sigma = xx$	DE ES FR EN IT PT	Ausreichend für "n" Tests Contenido suficiente para "n" tests Contenu suffisant pour "n" tests Contains sufficient for "n" tests Contenuto sufficiente per "n" saggi Contém o suficiente para "n" testes		DE ES FR EN IT PT	Inhalt Contenido del estuche Contenu du coffret Contents of kit Contenuto del kit Conteúdo do kit
 Max Min	DE ES FR EN IT PT	Temperaturbereich Limitación de temperatura Limites de température de conservation Temperature limitation Limiti di temperatura Temperaturas limites de conservação		DE ES FR EN IT PT	Bestellnummer Número de catálogo Références du catalogue Catalogue number Numero di Catalogo Número do catálogo
	DE ES FR EN IT PT	Vor direkter Sonneneinstrahlung schützen Mantener alejado de la luz solar Tenir à l'écart de la lumière du soleil Keep away from sunlight Tenere lontano dalla luce solare Mantenha longe da luz solar			