

17 beta-Estradiol

CE

1. INTRODUCTION

L'estradiol (17 beta-estradiol) est une hormone sexuelle. Il représente l'œstrogène principal chez les êtres humains. L'estradiol agit sur le fonctionnement des fonctions sexuelles et reproductrices et concerne les autres organes, y compris la structure osseuse. Pendant les années fertiles, la plus grande partie de l'estradiol chez les femmes est produite par les ovaires, de petites quantités sont produites par le cortex de la surrénale. Chez les hommes, l'estradiol est produit par les testicules. Dans le plasma, l'estradiol est lié à la globuline liant les hormones sexuelles (SHBG) et à l'albumine - seule la fraction libre est biologiquement active. La quantité d'estradiol sérique chez les femmes reflète avant tout l'activité des ovaires.

Les niveaux d'œstrogène augmentent constamment pendant la grossesse, jusqu'à la fin de l'état de grossesse. L'augmentation des taux d'estradiol entraîne la synthèse du placenta. Chez les femmes en pré-ménopause, la production ovarienne d'estradiol est stimulée par l'hormone de lutéinisation (LH) et par l'hormone folliculo-stimulante (FSH) pendant le cycle menstruel.

Chez les femmes, les taux d'estradiol mesurent la fertilité et les irrégularités menstruelles et ils sont nécessaires pour contrôler le bon fonctionnement des follicules ovariens pendant l'induction de l'ovulation. L'estradiol sert d'hormone pour le développement des tissus des organes reproducteurs et de guide pour le développement des caractéristiques sexuelles secondaires chez les femmes, mais il est également impliqué dans la fertilité masculine.

L'estradiol régule le maintien de la masse osseuse. Les femmes en ménopause subissent une accélération de la perte de la masse osseuse résultant du manque d'œstrogène.

L'estradiol affecte la synthèse des protéines, comme les lipoprotéines, des protéines porteuses et des protéines responsables de la coagulation.

Les œstrogènes ont une fonction neuroprotectrice. De par son activité, l'estradiol est impliquée dans certains types de cancer, comme le cancer du sein et celui du revêtement utérin. De plus, divers problèmes gynécologiques bénins dépendent des œstrogènes comme par exemple l'endométriose.

2. INDICATION D'UTILISATION

Méthode immunoenzymatique colorimétrique par compétition pour la détermination quantitative de la concentration de 17 beta-estradiol dans le sérum ou le plasma humain.

3. PRINCIPE DU DOSAGE

Le 17 beta-estradiol (antigène) présent dans l'échantillon rentre en compétition avec le 17 beta-estradiol antigénique marqué à de la peroxydase de raifort (HRP) par rapport à l'anticorps anti-17β-œstradiol adsorbé sur microplaque (phase solide). Après de la incubation la séparation libre-lié est obtenue par simple lavage de la phase solide. Après, l'enzyme présent dans la fraction liée catalyse la réaction entre le substrat (H₂O₂) et le substrat TMB (TMB), en développant une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt (H₂SO₄). L'intensité de la couleur développée est inversement proportionnelle à la concentration de 17 beta-estradiol dans l'échantillon. La concentration de 17 beta-estradiol dans l'échantillon est calculée sur la base d'une courbe d'étalonnage. Un lecteur de microplaques ELISA permet la lecture de l'absorption à 450 nm.

4. MATERIELS

4.1. Réactifs fournis

- **Puits recouverts d'Anti-17 beta-Estradiol** : 12 bandes détachables enduites d'Anti-17 beta-Estradiol de 8 puits, en sachet d'aluminium refermable.
- **Solution stop** : 1 flacon contenant 15 ml d'acide sulfurique, 0.15 mol/l (éviter tout contact avec la peau).
- **Conjugué 17 beta-Estradiol-HRP** : 1 flacon contenant 22 ml de 17 beta-Estradiol marqué à la peroxydase de raifort.
- **Solution de TMB** : 1 flacon contenant 15 ml de 3, 3', 5, 5'-Tétraméthylbenzidine (H₂O₂-TMB 0.26 g/l) (éviter tout contact avec la peau).
- **Solution de lavage (concentrée x 10)** : 1 flacon contenant 50 ml d'une solution de tampon phosphate concentrée 10 fois Tampon phosphaté 0,2 M, pH 7.4.
- **Contrôle**: 1 flacon contenant 0,5 ml d'un lot spécifique solution de contrôle prête à l'emploi. La concentration est indiquée sur l'étiquette.
- **Etalons**: 6 flacons, 1 ml d'etalon 0, 0,5 ml chacun etalon 1-5
 - Etalon 0: 0 pg/ml
 - Etalon 1: 20 pg/ml
 - Etalon 2: 120 pg/ml
 - Etalon 3: 300 pg/ml
 - Etalon 4: 600 pg/ml
 - Etalon 5: 2000 pg/ml

4.2. Matériels fournis

- 1 support de plaque
- 1 jeu de feuilles de recouvrement
- 1 mode d'emploi

4.3. Matériels et équipements requis

- Lecteur de microplaques ELISA, pour mesure l'absorbance à 450 nm, 620-630 nm
- Incubateur 37 °C
- Vortex
- Eau distillée
- Tubes jetables
- Chronomètre

5. STABILITE ET CONSERVATION

Les réactifs sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée sur l'étiquette s'ils sont conservés entre 2 °C et 8 °C à l'obscurité.

6. PREPARATION DES REACTIFS

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

6.1. Bandes détachables enduites

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

6.2. Conjugué 17 beta-Estradiol-HRP

Solution de conjugué prête à l'emploi. Mettre à agiter délicatement sur un agitateur rotatif pendant au moins 5 minutes. Stable 6 mois à 2-8 °C à compter de l'ouverture du flacon.

6.3. Etalons

Les étalons sont prêts à l'emploi.

Après la première utilisation les contrôles restent stables pendant encore 6 mois s'ils sont conservés à 2 – 8 °C.

6.4. Solution TMB

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

6.5. Solution stop

Le flacon contient 15 ml d'une solution d'acide sulfurique 0.15 M (R 36/38, S 26). Cette solution est prête à l'emploi et doit être conservée entre 2 °C et 8 °C.

6.6. Solution de lavage

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

6.7. Contrôle

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

7. PRELEVEMENT ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

La détermination de 17 beta-Estradiol peut être effectuée sur du plasma ou du sérum humain. Conserver les échantillons à -20 °C si la détermination n'est pas effectuée le jour du prélèvement. Si les échantillons sont conservés congelés, bien mélanger les échantillons décongelés avant le dosage. *Eviter les cycles répétés de congélation et de décongélation.*

8. PROCEDE DU DOSAGE

8.1. Préparation du dosage

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

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

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

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

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

Régler l'incubateur à 37°C.

1. Pipeter 25 µl des étalons, de contrôle et d'échantillons dans leurs puits respectifs. Ajouter 200 µl de conjugué dans chaque puits. Garder le puits A1 pour le blanc.
2. Couvrir les puits avec le couvercle fourni dans le kit.
3. **Incuber pendant 2 heures à 37 °C.**
4. À la fin de l'incubation, enlever le couvercle, aspirer le contenu des puits et laver chaque puits trois fois avec 300 µl de solution de lavage diluée. Eviter les débordements de puits de réaction.
Note importante : Pendant chaque pas de lessive, secouez doucement la plaque depuis 5 secondes et enlevez la solution d'excès en tapant la plaque inversée sur un essuie-mains en papier absorbant.

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

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

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

8.2. Mesure

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

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

Mesurer l'absorbance de tous les puits à **450 nm** et enregistrer les valeurs d'absorbance pour chaque contrôle et échantillon de patient dans le plan de distribution et d'identification.

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

9. CONTROLE QUALITE

Chaque laboratoire doit faire des contrôles de dosage à des niveaux de gammes normales, élevées et faibles de testostérone libre pour surveiller la performance des dosages. Ces contrôles doivent être considérés comme inconnus et les valeurs doivent être déterminées dans chaque test effectué. Les chartes de contrôles qualité doivent être maintenues pour suivre les performances des réactifs fournis. Des méthodes de statistiques pertinentes doivent être employées pour établir des tendances. Le laboratoire individuel doit établir des limites de performance de dosage acceptables.

D'autres paramètres devant être surveillés impliquent les intersections à 80, 50 et 20% de la courbe étalon pour la reproductibilité. De plus, l'absorbance maximale doit être dans la même ligne que les expériences passées. Les déviations significatives provenant des performances établies peuvent indiquer un changement non remarquable dans les conditions expérimentales ou dans la dégradation des réactifs du kit. Les réactifs frais doivent être utilisés pour déterminer la raison des variations.

10. RESULTATS

10.1. Calcul des résultats

Calculer l'absorbance moyenne pour chaque point de la courbe étalon et de chaque échantillon. Tracer la valeur d'absorbance moyenne des étalons par rapport à la concentration. Dessiner le meilleur ajustement de la courbe sur les points tracés (4 paramètres logistiques).

Interpoler les valeurs des échantillons sur la courbe étalon pour obtenir les valeurs de concentrations correspondantes en pg/ml.

10.2. Valeurs de Référence

Les concentrations des sérums de 17 beta-Estradiol sont dans le tableau suivant :

		pg/ml
FEMMES	Phase folliculaire	30 – 100
	Pic ovulatoire	130 – 350
	Phase lutéale	50 – 180
	Ménopause	< 60
ENFANTS		< 40
HOMMES		< 60

Prenez garde au fait que la détermination d'une gamme de valeurs attendues pour une population "normale" d'une méthode donnée dépend de plusieurs facteurs, comme la spécificité et la sensibilité de la méthode utilisée et le genre de population étudiée. Par conséquent chaque laboratoire doit considérer que la gamme donnée comme une indication générale par le fabricant et produit sa propre gamme de valeurs attendues basée sur la population où est situé le laboratoire.

11. PERFORMANCE DU DOSAGE

11.1. Précision

Variation Intra Dosage

La variation intra dosage a été déterminée par un répliquant (10x) sur trois sérums différents dans un dosage. La variation intra dosage est ≤ 9%.

Variation Inter Dosage

La variation inter dosage a été déterminée en répliquant la mesure de trois sérums de contrôle différents en lots différents. La variation inter dosage est ≤ 10%.

11.2. Spécificité analytique

La réaction croisée des anticorps calculée à 50% selon Abraham :

17 beta-Estradiol	100 %
Estrone	2 %
Estriol	0.39 %
Fulvestrant	0.09 %
Testostérone	0.02 %
Cortisol	< 7x10 ⁻³ %
Progestérone	< 3x10 ⁻⁴ %
DHEA-S	< 1x10 ⁻⁴ %

Note importante

Le fulvestrant est un composé chimique qui se trouve dans la formulation de certains médicaments utilisés dans le traitement de certains types de cancers chez les femmes ménopausées; En raison de sa similarité chimique avec Estradiol, la molécule de Fulvestrant peut interférer avec le test et conduire à une sur-estimation des niveaux d'Estradiol dans l'échantillon.

Dans le cas de patients sous traitement par Fulvestrant, il est recommandé de vérifier les données cliniques obtenues avec le kit 17 beta-Estradiol avec d'autres données de quantification de l'Estradiol afin de vérifier l'interférence du Fulvestrant.

11.3. Sensibilité Analytique

La plus petite concentration détectable de 17 beta-Estradiol par l'étalon 0 est 8.68 pg/ml avec une limite de confiance de 95%.

11.4. Exactitude

L'épreuve de dilution conduite sur des échantillons à haute concentration de 17 beta-Estradiol a donné une valeur de récupération moyenne (\pm SD) de 95,69 % \pm 7,74%.

L'épreuve de récupération conduite sur des échantillons enrichis avec 120 - 240 - 480 - 960 pg/ml d'estradiol a donné une valeur moyenne (\pm SD) de 101,09% \pm 5,42%.

11.5. Comparaison de méthode

Le NovaTec 17 beta-Estradiol a été comparé avec un test disponible en commerce. 16 échantillons de sérum ont été testés.

La courbe de régression est :

$$(17 \text{ beta-Estradiol NovaTec}) = 1,03 * (17 \text{ beta-Estradiol Réf}) - 12,96$$
$$r^2 = 0,996$$

12. PRECAUTIONS ET AVERTISSEMENTS

- En accord avec l'article 1 paragraphe 2b de la directive européenne 98/79/EC, l'utilisation des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro est destinée par le fabricant à garantir la pertinence, les performances et la sécurité du produit. Par conséquent, la procédure de dosage, l'information, les précautions et mises en garde du mode d'emploi doivent être suivies de façon stricte. L'utilisation de ces kits avec des automates ou dispositifs similaires doit être validée. Aucun changement de la conception, composition et procédure de dosage, ainsi que l'utilisation avec d'autres produits non approuvés par le fabricant, ne sont autorisés ; seul l'utilisateur est responsable de tels changements. Le fabricant n'est pas responsable des faux résultats et des incidents dus à ces modifications. Le fabricant n'est pas responsable des résultats fournis par analyse visuelle des échantillons des patients.
- Uniquement pour diagnostic in vitro par un personnel qualifié . Ne pas utiliser pour usage interne ou externe chez les Humains ou les Animaux.
- Suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) pour la manipulation de produits sanguins.
- Tous les composants d'origine humaine utilisés pour la fabrication de ces réactifs ont été analysés et ont été testés non réactifs aux antigènes HBs, en anticorps anti-VIH et en anticorps anti-VHC. Néanmoins, tous les produits doivent être considérés et traités comme étant potentiellement infectieux.
- Ne pas échanger les réactifs ou les bandes provenant de différents lots de production.
- Ne pas utiliser de réactifs provenant d'autres fabricants avec les réactifs de ce kit.
- Ne pas utiliser les réactifs après la date de péremption indiquée sur l'étiquette.
- Utiliser seulement des cônes de pipette, des distributeurs et du matériel de laboratoire propres.
- Ne pas échanger les bouchons des flacons, pour éviter la contamination croisée
- Fermer les flacons de réactifs immédiatement après l'utilisation pour éviter l'évaporation et la contamination microbienne.
- Avant une nouvelle utilisation, vérifier les flacons de conjugué et de contrôle, déjà utilisés, pour exclure une contamination microbienne.
- Pour éviter la contamination croisée et des résultats faussement élevés, introduire les échantillons de patients et le conjugué exactement au fond des puits en évitant les éclaboussures.
- Quand l'utilisation a automatisé l'équipement, l'utilisateur a la responsabilité de s'assurer que le kit a été convenablement évalué.
- Si le liquide n'est pas complètement extrait des puits, cela peut influencer la précision du dosage et/ou augmenter le bruit de fond. Pour améliorer la performance du kit sur les systèmes automatiques ELISA, on recommande d'augmenter le nombre de se lave.
- Certains réactifs contiennent de petites quantités de Proclin 300^R comme conservateur. Eviter tout contact avec peau et les muqueuses.
- Le TMB est irritant, ce qui peut être nocif s'il est inhalé, ingéré ou absorbé à travers la peau. Eviter toute inhalation, ingestion ou contact avec la peau et les yeux pour prévenir de ces risques.
- La solution stop est une solution d'acide sulfurique diluée. L'aide sulfurique est un poison corrosif et peut être toxique s'il est ingéré. Eviter tout contact avec la peau ou les yeux pour prévenir des brûlures chimiques.
- Éviter l'exposition du réactif TMB/H₂O₂ à la lumière directe du soleil, aux métaux et aux substances oxydantes. Ne pas congeler la solution.
- Cette méthode permet de déterminer des concentrations de 17 beta-Estradiol de 20 pg/ml à 2000 pg/ml.
- Suivre la notice pour les contrôles qualité dans les laboratoires médicaux en dosant les contrôles et/ou les sérums.
- Observer la plus grande précision dans la reconstitution et la distribution des réactifs.
- Les échantillons microbiologiquement contaminés ne doivent pas être utilisés pour le dosage. Les échantillons hautement lipémiques ou hémolysés ne doivent pas être utilisés non plus.
- Les lecteurs de microplaques mesurent verticalement. Ne pas toucher le fond des puits.

- L'administration de stéroïdes naturels ou synthétiques peut altérer les niveaux de 17 beta-Estradiol dans le sang.
- L'addition de la solution de substrat initie la réaction cinétique qui se termine par l'ajout de solution stop. Par conséquent, l'addition de solution de substrat et de solution stop doit être fait durant la manipulation pour éliminer tous risques de dépassement de la durée de réaction.

12.1. Elimination des déchets

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

13. INFORMATION POUR LES COMMANDES

Prod. No.:

DNOV003

17 beta-Estradiol (96 Dosages)