

ИНСТРУКЦИЯ ПО ПРИМЕНЕНИЮ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СВОБОДНОГО ЭСТРИОЛА В СЫВОРОТКЕ И ПЛАЗМЕ КРОВИ «СВЭСТРИОЛ-ИФА»

Рекомендована к утверждению экспертной комиссией по наборам реагентов для иммуноферментного (неинфекционные), радиоиммунологического и других видов иммунохимического анализа Комитета по новой медицинской технике Минздрава РФ (Протокол № 7 от 19 августа 2002 г.)

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. Набор реагентов «свЭСТРИОЛ-ИФА» предназначен для количественного определения концентрации свободного эстриола в сыворотке и плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа.

1.2. Свободный (неконъюгированный) эстриол (ЕЗ) представляет собой стероидный гормон с молекулярной массой 288 Да. У небеременных женщин и мужчин биосинтез эстриола незначительный и сывороточная концентрация мало отличается между полами. Во время беременности эстриол синтезируется в плаценте в результате многоступенчатого метаболического пути, поэтому концентрация в сыворотке беременных женщин нарастает в течение всей беременности. В связи широким диапазоном нормальных концентрации свободного ЕЗ на различных сроках беременности, рекомендуется определять динамику изменения концентрации.

1.3. Биологическая роль эстриола заключается в поддержании кровотока в маточных сосудах и дифференцировки протоков молочных желез.

1.4. Определение ЕЗ во втором триместре беременности показано для оценки риска синдрома Дауна, совместно с другими лабораторными тестами (АФП, бета-ХГ). При синдроме Дауна уровень ЕЗ в сыворотке беременной имеет тенденцию к снижению. Помимо оценки риска во втором триместре снижение уровня ЕЗ может указывать на опасные нарушения функционирования фето-плацентарного аппарата: угрозу выкидыша, пузырный занос, фето-плацентарную недостаточность, внутриутробные инфекции.

1.5. Повышение уровня эстриола встречается при многоплодной беременности и крупном плоде.

2. ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

Определение свободного эстриола основано на использовании конкурентного иммуноферментного анализа. На внутренней поверхности лунок планшета иммобилизованы кроличьи поликлональные антитела к эстриолу. Свободный эстриол из образца конкурирует с конъюгированным эстриолу за связывание с антителами на поверхности лунки. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич», содержащий пероксидазу. Во время инкубации с раствором субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации свободного эстриола в исследуемом образце. Концентрацию свободного эстриола в исследуемых образцах определяют по калибровочному графику зависимости оптической плотности от содержания свободного эстриола в калибровочных пробах.

3. АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

3.1. Специфичность. Перекрестная реакция кроличьих поликлональных антител к свободному эстриолу с другими анализатами приведена в таблице:

| Аналит | Перекрестная реакция, % |
|---------------|-------------------------|
| Эстрадиол | 0.8 |
| Эстрон | 0.3 |
| 16-эпиэстриол | 1.9 |
| Кортикостерон | <0.1 |

3.2. Воспроизводимость.

Коэффициент вариации результатов определения содержания свободного эстриола в одном и том же образце сыворотки (плазмы) крови с использованием Набора «свЭСТРИОЛ-ИФА» не превышает 8.0%.

3.3. Линейность.

Зависимость концентрации свободного эстриола в образцах сыворотки (плазмы) крови при разведении их сывороткой (плазмой) крови, не содержащей свободный эстриол, имеет линейный характер в диапазоне концентраций 0.5–50 нмоль/л и составляет $\pm 10.0\%$.

3.4. Точность.

Данный аналитический параметр проверяется тестом на «открытие» – соответствие измеренной концентрации свободного эстриола предписанной, полученной путем смешивания равных объемов контрольной сыворотки и калибровочной пробы 1.5 нмоль/л. Процент «открытия» составляет 90–110%.

3.5. Чувствительность.

Минимальная достоверно определяемая Набором «свЭСТРИОЛ-ИФА» концентрация свободного эстриола в сыворотке (плазме) крови не превышает 0.12 нмоль/л.

4. СОСТАВ НАБОРА

| Код компонента | Символ | Наименование | Кол-во | Ед. | Описание |
|----------------|--------|--------------|--------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | R218Z | SORB MTP | 1 | шт. | - |
| 2 | C218Z | CAL 1-6 | 6 | шт | прозрачные жидкости синего цвета (калрибровочная проба 0 - прозрачная бесцветная жидкость) |
| 3 | Q218Z | CONTROL | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 4 | T218Z | CONJ HRP | 1 | шт. | прозрачная жидкость зеленого цвета |
| 5 | R055Z | SUBS TMB | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 6 | S008Z | BUF WASH 26X | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 7 | R050Z | STOP | 1 | шт. | прозрачная бесцветная жидкость |
| 8 | N003 | - | 2 | шт. | - |
| 9 | K2181 | - | 1 | шт. | - |
| 10 | K218Q | - | 1 | шт. | - |

5. МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ

5.1. Потенциальный риск применения Набора – класс 26 (ГОСТ Р 51609-2000).

5.2. Все компоненты Набора, за исключением стоп-реагента (5.0% раствор серной кислоты), в используемых концентрациях являются нетоксичными.

Раствор серной кислоты обладает раздражающим действием. Избегать разбрызгивания и попадания на кожу и слизистые. При попадании на кожу и слизистые пораженный участок следует промыть большим количеством проточной воды.

5.3. При работе с Набором следует соблюдать «Правила устройства, техники безопасности, производственной санитарии, противоэпидемического режима и личной гигиены при работе в лабораториях (отделениях, отделах) санитарно-эпидемиологических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР» (Москва, 1981 г.).

5.4. При работе с Набором следует надевать одноразовые резиновые или пластиковые перчатки, так как образцы крови человека следует рассматривать как потенциально инфицированный материал, способный длительное время сохранять и передавать ВИЧ, вирус гепатита или любой другой возбудитель вирусной инфекции.

6. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

- фотометр вертикального сканирования, позволяющий измерять оптическую плотность содержимого лунок планшета при длине волны 450 нм;
- термостат, поддерживающий температуру $+37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- дозаторы со сменными наконечниками, позволяющие отбирать объемы в диапазоне 25–250 мкл;
- цилиндр мерный вместимостью 1000 мл;
- вода дистиллированная;
- перчатки резиновые или пластиковые;
- бумага фильтровальная.

7. ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

7.1. Перед проведением анализа компоненты Набора и исследуемые образцы сыворотки (плазмы) крови следует выдержать при комнатной температуре ($+18...+25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не менее 30 мин.

7.2. Приготовление планшета.

Вскрыть пакет с планшетом и установить на рамку необходимое количество стрипов. Оставшиеся неиспользованными стрипы, чтобы предотвратить воздействие на них влаги, тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре $+2...+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение всего срока годности Набора.

7.3. Приготовление отмывочного раствора.

Содержимое флакона с концентратом отмывочного раствора (22 мл), перенести в мерный цилиндр вместимостью 1000 мл, добавить 550 мл дистиллированной воды и тщательно перемешать. В случае дробного использования Набора следует отобрать необходимое количество концентрата отмывочного раствора и развести дистиллированной водой в 26 раз (1 мл концентрата отмывочного раствора + 25 мл дистиллированной воды).

8. УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА

8.1. Набор реагентов «свЭСТРИОЛ-ИФА» должен храниться в упаковке предприятия-изготовителя при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности, указанного на упаковке Набора.

Допускается хранение (транспортировка) Набора при температуре до +25 °С не более 15 суток. Не допускается замораживание целого набора.

8.2. Набор рассчитан на проведение анализа в дубликатах 41 исследуемых образцов, 6 калибровочных проб и 1 пробы контрольной сыворотки (всего 96 определений).

8.3. В случае дробного использования Набора компоненты следует хранить следующим образом:

- оставшиеся неиспользованными стрипы необходимо тщательно заклеить бумагой для заклеивания планшета и хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- конъюгат, субстрат, стоп-реагент после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора;
- калибровочные пробы и контрольную сыворотку после вскрытия флаконов следует хранить при температуре +2...+8 °С не более 2 месяцев;
- оставшийся неиспользованным концентрат отмывочного раствора следует хранить при температуре +2...+8 °С в течение всего срока годности Набора. Приготовленный отмывочный раствор следует хранить при комнатной температуре (+18...+25 °С) не более 15 суток или при температуре +2...+8 °С не более 45 суток.

Примечание. После использования реагента немедленно закрывайте крышку флакона. Закрывайте каждый флакон своей крышкой.

8.4. Для проведения анализа не следует использовать гемолизированную, мутную сыворотку (плазму) крови, а также сыворотку (плазму) крови, содержащую азид натрия. Если анализ производится не в день взятия крови, сыворотку (плазму) следует хранить при температуре -20 °С. Повторное замораживание-оттаивание образцов сыворотки (плазмы) крови не допускается.

8.5. Исключается использование для анализа образцов сыворотки (плазмы) крови людей, получавших в целях диагностики или терапии препараты, в состав которых входят мышинные антитела.

8.6. При использовании Набора для проведения нескольких независимых серий анализов следует иметь в виду, что для каждого независимого определения необходимо построение нового калибровочного графика; кроме этого, рекомендуется определение концентрации свободного эстриола в контрольной сыворотке.

8.7. Для получения надежных результатов необходимо строгое соблюдение Инструкции по применению Набора.

8.8. Не используйте компоненты из других наборов или из аналогичных наборов других серий.

9. ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

| | |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Поместите в рамку необходимое количество стрипов – исследуемые образцы в 2 повторах и 12 лунок для калибровочных проб и контрольной сыворотки. |
| 2 | Внесите в соответствующие лунки в дубликатах по 25 мкл калибровочной пробы и контрольной сыворотки. В остальные лунки внесите в дубликатах по 25 мкл исследуемых образцов сыворотки (плазмы) крови. Внесение калибровочных проб, контрольной сыворотки и исследуемых образцов необходимо произвести в течение 15 минут. |
| 3 | Внесите во все лунки по 100 мкл конъюгата. |
| 4 | Заклейте планшет бумагой для заклеивания планшета и инкубируйте его в течение 120 минут при температуре +37 °С. |
| 5 | По окончании инкубации удалите содержимое лунок и отмойте лунки 5 раз . При каждой отмывке добавляйте во все лунки по 250 мкл отмывочного раствора (см. п. 7.3), встряхните планшет круговыми движениями по горизонтальной поверхности с последующей аспирацией или декантированием. Задержка при отмывке (замачивание лунок) не требуется. При каждом декантировании необходимо тщательно удалять остатки жидкости из лунок постукиванием планшета в перевернутом положении по фильтровальной бумаге. |
| 6 | Внесите во все лунки по 100 мкл раствора субстрата тетраметилбензидина. Внесение раствора субстрата тетраметилбензидина в лунки необходимо произвести в течение 2–3 мин. Инкубируйте планшет в темноте при комнатной температуре (+18...+25 °С) в течение 10–20 минут в зависимости от степени развития синего окрашивания. |
| 7 | Внесите во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как и раствор субстрата тетраметилбензидина, по 100 мкл стоп-реакнта , при этом содержимое лунок окрашивается в ярко-желтый цвет. |
| 8 | Измерьте величину оптической плотности (ОП) содержимого лунок планшета на фотометре вертикального сканирования при длине волны 450 нм. Измерение ОП содержимого лунок планшета необходимо произвести в течение 15 мин после внесения стоп-реакнта. Бланк фотометра выставьте по воздуху. |
| 9 | Постройте в полулогарифмических координатах калибровочный график: ось абсцисс (x) – десятичный логарифм концентрации свободного эстриола в калибровочных пробах (нмоль/л), ось ординат (y) – оптическая плотность калибровочных проб (ОП 450 нм). Для алгоритма обчета (аппроксимации) калибровочного графика используйте интервальный (кусочно-линейный, «от точки к точке») метод. Приравняйте концентрацию калибровочной пробы 0 нмоль/л к несущественно малой величине, например, 0,001 нмоль/л |
| 10 | Определите по калибровочному графику содержание свободного эстриола в исследуемых образцах. |

10. ОЖИДАЕМЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И НОРМЫ

10.1. Основываясь на результатах исследований, проведенных ООО «ХЕМА», рекомендуем пользоваться нормами, приведенными ниже. Вместе с тем, в соответствии с правилами GLP (Хорошей лабораторной практики), каждая лаборатория должна сама определить параметры нормы, характерные для обследуемой популяции.

Примечание. Значения концентраций свободного эстриола в исследуемых образцах, находящиеся ниже границы чувствительности Набора (0.12 нмоль/л), а также превышающие значение верхней калибровочной пробы (50 нмоль/л) следует приводить в следующей форме: в исследуемом образце X концентрация свободного эстриола ниже 0.12 нмоль/л или выше 50 нмоль/л.

В Наборе «свЭСТРИОЛ-ИФА» значения концентраций калибровочных проб выражены в нмоль/л. Для пересчета концентраций в нг/мл, полученное значение концентрации в нмоль/л следует умножить на 0.288.

1 нмоль/л = 0.288 нг/мл

| Исследуемая группа | Единицы, нмоль/л | | Единицы доп., нг/мл | |
|--------------------|------------------|----------------|---------------------|----------------|
| | Нижний предел | Верхний предел | Нижний предел | Верхний предел |
| Мужчины | - | 1.0 | - | 0.29 |
| Женщины | - | 1.5 | - | 0.43 |
| Беременные, неделя | | | | |
| 22-23 | 5.0 | 20.0 | 1.4 | 5.8 |
| 24-25 | 5.5 | 24.5 | 1.6 | 7.1 |
| 26-27 | 6.3 | 27.9 | 1.8 | 8.0 |
| 28-29 | 6.4 | 31.0 | 1.8 | 8.9 |
| 30-32 | 7.3 | 32.9 | 2.1 | 9 |
| 33-34 | 9.9 | 40.3 | 2.9 | 11.6 |
| 35-36 | 12.2 | >50 | 3.5 | >14.4 |
| 37-38 | 15.5 | >50 | 4.5 | >14.4 |
| 39-40 | 16.5 | >50 | 4.8 | >14.4 |
| 40-42 | 17.5 | >50 | 5.0 | >14.4 |

Медианы и СКО (рекомендуемый диапазон норм 0.5-2.0 МОМ)

| Беременные, неделя | Медиана, нмоль/л | СКО |
|--------------------|------------------|------|
| 14 | 3.8 | 0.51 |
| 15 | 5.3 | 0.76 |
| 16 | 6.2 | 0.85 |
| 17 | 7.3 | 0.94 |
| 18 | 9.9 | 1.05 |
| 19 | 10.7 | 1.10 |
| 20 | 11.9 | 1.08 |
| 21 | 13.2 | 1.08 |

11. ЛИТЕРАТУРА

1. Reynold C. Merrill – Estriol: A Review. *Physiol Rev*, Jul 1958; 38: 463 – 480.
2. Karlla K. Welch and Fergal D. Malone – Advances in Prenatal Screening: Maternal Serum Screening for Down Syndrome. *NeoReviews*, Oct 2002; 3: 209.
3. Dan Tulchinsky – Placental Secretion of Unconjugated Estrone, Estradiol and Estriol into the Maternal and the Fetal Circulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Jun 1973; 36: 1079 – 1087.

По вопросам, касающимся качества Набора **«свЭСТРИОЛ-ИФА»**, следует обращаться в ООО «ХЕМА» по адресу:
105043, г. Москва, а/я 58
105264, г. Москва, ул. 9-я Парковая, д. 48, 1-й под., 5 этаж,
тел/факс (495) 737-39-36, 737-00-40, 510-57-07 (многоканальный)

электронная почта: info@xema.ru; rqs@xema.ru
интернет: www.xema.ru; www.xema-medica.com

Руководитель службы клиентского сервиса ООО «ХЕМА»,
к. б. н. Д. С. Кострикин

*Instruction for use***A SOLID-PHASE ENZYME IMMUNOASSAY
FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION
OF FREE ESTRIOL IN HUMAN SERUM OR PLASMA****1. INTENDED USE**

A solid-phase enzyme immunoassay for the quantitative determination of free estriol in blood serum or plasma.

This kit is designed for measurement of free estriol in blood serum or plasma. For possibility of use with other sample types, please, refer to Application Notes (on request). The kit contains reagents sufficient for 96 determinations and allows to analyze 41 unknown samples in duplicates.

2. SUMMARY AND EXPLANATION

Free (non-conjugated) Estriol (E3) is a steroid hormone with a MM of 288 Da. Production of Estriol in non-pregnant women and men is negligible with no sex-related differences. During pregnancy, Estriol is produced in placenta by a multistep metabolic pathway, and its serum level is continuously growing up to delivery. Due to wide normal ranges of Free E3 at different pregnancy terms, serial determinations to monitor Estriol level are recommended.

Estriol biological function is to maintain blood flow in maternal blood vessels and to provide for differentiation of mammary ducts.

During 2nd trimester, E3 determination in conjunction with other tests (AFP, beta-HCG) is used to estimate risk of Down syndrome in fetus: a tendency of serum E3 level to decline is indicative of Down syndrome. Besides, a decline of E3 serum level during the 2nd trimester may indicate dangerous fetoplacental insufficiency (an increased risk of miscarriage, intra-uterine infections, etc.).

Increased E3 levels are seen in multifetal pregnancy and in case of a fetus bigger than normal.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

This test is based on competition enzyme immunoassay principle. Tested specimen is placed into the microwells coated by specific rabbit polyclonal to estriol-antibodies simultaneously with conjugated free Estriol-peroxidase. Free Estriol from the specimen competes with the conjugated free Estriol for coating antibodies. After washing procedure, the remaining enzymatic activity bound to the microwell surface is detected and quantified by addition of chromogen-substrate mixture, stop solution and photometry at 450 nm. Optical density in the microwell is inversely related to the quantity of the measured analyte in the specimen.

4. WARNINGS AND PRECAUTIONS

4.1. For professional use only.

4.2. This kit is intended for in vitro diagnostic use only.

4.3. INFECTION HAZARD: There is no available test methods that can absolutely assure that Hepatitis B and C viruses, HIV-1/2, or other infectious agents are not present in the reagents of this kit. All human products, including patient samples, should be considered potentially infectious. Handling and disposal should be in accordance with the procedures defined by an appropriate national biohazard safety guidelines or regulations.

4.4. Avoid contact with stop solution containing 5.0% H₂SO₄. It may cause skin irritation and burns.

4.5. Wear disposable latex gloves when handling specimens and reagents. Microbial contamination of reagents may give false results.

4.6. Do not use the kit beyond the expiration date.

4.7. All indicated volumes have to be performed according to the protocol. Optimal test results are only obtained when using calibrated pipettes and microplate readers.

4.8. Do not smoke, eat, drink or apply cosmetics in areas where specimens or kit reagents are handled.

4.9. Chemicals and prepared or used reagents have to be treated as hazardous waste according to the national biohazard safety guidelines or regulations.

4.10. Do not mix reagents from different lots.

4.11. Replace caps on reagents immediately. Do not swap caps.

4.12. Do not pipette reagents by mouth.

4.13. Specimens must not contain any AZIDE compounds – they inhibit activity of peroxidase.

4.14. Material Safety Data Sheet for this product is available upon request directly from XEMA Co., Ltd.

4.15. The Material Safety Data Sheet fit the requirements of EU Guideline 91/155 EC.

5.1. Contents of the Kit

5. KIT COMPONENTS

| Symbol | Description | Qty | Units | Colour code | Stability of opened/ diluted components |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-------|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 SORB MTP | free Estriol EIA strips, 8x12 wells | 1 | pcs | | until exp. date |
| 2 CAL 1-6 | Calibrator set, 0.8 ml each. The set contains 6 calibrators: 0; 0.5; 1.5; 5; 15; 50 nmol/l | 6 | pcs | blue (C1 – colourless) | 2 months |
| 3 CONTROL | Control serum (0.8 ml) | 1 | pcs | colourless | 2 months |
| 4 CONJ HRP | Conjugate, 14 ml | 1 | pcs | green | until exp. date |
| 5 SUBS TMB | Substrate solution, 14 ml | 1 | pcs | colourless | until exp. date |
| 6 BUF WASH 26X | Washing solution concentrate 26X, 22 ml | 1 | pcs | colourless | Concentrate - until exp.date Diluted washing solution - 45 days at 2-8 °C or 15 days at RT |
| 7 STOP | Stop solution, 14 ml | 1 | pcs | colourless | until exp. date |
| 8 N003 | Plate sealing tape | 2 | pcs | | N/A |
| 9 K2181 | Instruction free Estriol EIA | 1 | pcs | | N/A |
| 10 K218Q | QC data sheet free Estriol EIA | 1 | pcs | | N/A |

5.2. Equipment and material required but not provided

- Distilled or deionized water;
- Automatic or semiautomatic multichannel micropipettes, 100–250 µl, is useful but not essential;
- Calibrated micropipettes with variable volume, range volume 25–250 µl;
- Dry thermostat for 37 °C ±0.1 °C;
- Calibrated microplate photometer with 450 nm wavelength and OD measuring range 0–3.0

5.3. Storage and stability of the Kit

Store the whole kit at +2...+8 °C upon receipt until the expiration date.

After opening the pouch keep unused microtiter wells TIGHTLY SEALED BY ADHESIVE TAPE (INCLUDED) to minimize exposure to moisture.

6. SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

This kit is intended for use with serum or plasma (ACD- or heparinized). Grossly hemolytic, lipemic, or turbid samples should be avoided.

Specimens may be stored for up to 48 hours at +2...+8 °C before testing. For a longer storage, the specimens should be frozen at -20 °C or lower. Repeated freezing/thawing should be avoided.

7. TEST PROCEDURE**7.1. Reagent Preparation**

- All reagents (including unsealed microstrips) should be allowed to reach room temperature (+18...+25 °C) before use.
- All reagents should be mixed by gentle inversion or vortexing prior to use. Avoid foam formation.
- It is recommended to spin down shortly the tubes with calibrators on low speed centrifuge.
- Prepare washing solution from the concentrate BUF WASH 26X by 26 dilutions in distilled water.

7.2. Procedural Note:

It is recommended that pipetting of all calibrators and samples should be completed within 3 minutes.

7.3. Assay flowchart

See the example of calibration graphic in Quality Control data sheet.

7.4. Alternative units:

1 nmol/l = 0.288 ng/ml

7.5. Assay procedure

| | |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Put the desired number of microstrips into the frame; allocate 12 wells for the calibrators CAL 1–6 and control samples CONTROL and two wells for each unknown sample. DO NOT REMOVE ADHESIVE SEALING TAPE FROM UNUSED STRIPS. |
| 2 | Pipet 25 µl of calibrators CAL 1–6, control samples CONTROL and unknown samples into the wells. |
| 3 | Dispense 100 µl of CONJ HRP into the wells. Cover the wells by plate adhesive tape (included into the kit). |
| 4 | Incubate 120 minutes at 37 °C. |
| 5 | Prepare washing solution by 26X dilution of washing solution concentrate (BUF WASH 26X) by distilled water. Wash the strips 5 times. |
| 6 | Dispense 100 µl of SUBS TMB into the wells. |
| 7 | Incubate 10-20 minutes at +18...+25 °C. |
| 8 | Dispense 100 µl of STOP into the wells. |
| 9 | Measure OD (optical density) at 450 nm. |
| 10 | Set photometer blank on air. |
| 11 | Apply lin-log method for data reduction. |

8. QUALITY CONTROL

It is recommended to use control samples according to state and federal regulations. The use of control samples is advised to assure the day to day validity of results.

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

The test results are valid only if all controls are within the specified ranges and if all other test parameters are also within the given assay specifications.

9. CALCULATION OF RESULTS

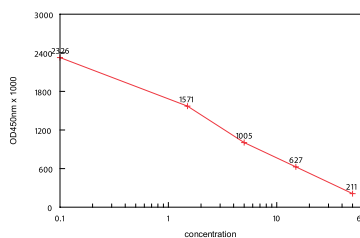
9.1. Calculate the mean absorbance values (OD450) for each pair of calibrators and samples.

9.2. Plot a calibration curve on graph paper: OD versus free estriol concentration.

9.3. Determine the corresponding concentration of free estriol in unknown samples from the calibration curve. Manual or computerized data reduction is applicable on this stage. Point-by-point or linear data reduction is recommended due to non-linear shape of curve.

9.4. Below is presented a typical example of a standard curve with the XEMA Co. Not for calculations!

| Calibrators | Value | Absorbance Units (450 nm) x 1000 |
|-------------|------------|----------------------------------|
| CAL 1 | 0 nmol/l | 1606 |
| CAL 2 | 0.5 nmol/l | 1268 |
| CAL 3 | 1.5 nmol/l | 1078 |
| CAL 4 | 5 nmol/l | 812 |
| CAL 5 | 15 nmol/l | 569 |
| CAL 6 | 50 nmol/l | 377 |



10. EXPECTED VALUES

Therapeutical consequences should not be based on results of IVD methods alone – all available clinical and laboratory findings should be used by a physician to elaborate therapeutically measures. Each laboratory should establish its own normal range for free Estriol. Based on data obtained by XEMA, the following normal range is recommended (see below). NOTE: the patients that have received murine monoclonal antibodies for radioimaging or immunotherapy develop high titered anti-mouse antibodies (HAMA). The presence of these antibodies may cause false results in the present assay. Sera from HAMA positive patients should be treated with depleting adsorbents before assaying.

| Sex, age | Units nmol/l | | Units alternative ng/ml | |
|------------|-----------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | Lower limit | Upper limit | Lower limit | Upper limit |
| Males | - | 1.0 | - | 0.29 |
| Females | - | 1.5 | - | 0.43 |
| Pregnancy: | | | | |
| 22-23 | 5.0 | 20.0 | 1.4 | 5.8 |
| 24-25 | 5.5 | 24.5 | 1.6 | 7.1 |
| 26-27 | 6.3 | 27.9 | 1.8 | 8.0 |
| 28-29 | 6.4 | 31.0 | 1.8 | 8.9 |
| 30-32 | 7.3 | 32.9 | 2.1 | 9.0 |
| 33-34 | 9.9 | 40.3 | 2.9 | 11.6 |
| 35-36 | 12.2 | >50 | 3.5 | >14.4 |
| 37-38 | 15.5 | >50 | 4.5 | >14.4 |
| 39-40 | 16.5 | >50 | 4.8 | >14.4 |
| 40-42 | 17.5 | >50 | 5.0 | >14.4 |

| Pregnancy, week | Median, nmol/l | SKO |
|-----------------|----------------|------|
| 14 | 3.8 | 0.51 |
| 15 | 5.3 | 0.76 |
| 16 | 6.2 | 0.85 |
| 17 | 7.3 | 0.94 |
| 18 | 9.9 | 1.05 |
| 19 | 10.7 | 1.10 |
| 20 | 11.9 | 1.08 |
| 21 | 13.2 | 1.08 |

11. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

11.1. Analytical specificity / Cross reactivity

| Analyte | Cross-reactivity, % wt/wt |
|----------------|---------------------------|
| Estradiol | 0.8 |
| Estron | 0.3 |
| 16-epiestriol | 1.9 |
| Corticosterone | <0.1 |

11.2. Analytical sensitivity.

Sensitivity of the assay was assessed as being 0.12 nmol/l.

11.3. Linearity.

Linearity was checked by assaying dilution series of 5 samples with different free estriol concentrations. Linearity percentages obtained ranged within 90 to 110%.

11.4. Recovery. Recovery was estimated by assaying 5 mixed samples with known free estriol concentrations. The recovery percentages ranged from 90 to 110%.

12. LITERATURE

1. Reynold C. Merrill – Estriol: A Review. *Physiol Rev*, Jul 1958; 38: 463 – 480.
2. Karlla K. Welch and Fergal D. Malone – Advances in Prenatal Screening: Maternal Serum Screening for Down Syndrome. *NeoReviews*, Oct 2002; 3: 209.
3. Dan Tulchinsky – Placental Secretion of Unconjugated Estrone, Estradiol and Estriol into the Maternal and the Fetal Circulation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Jun 1973; 36: 1079 – 1087.