Afdeling SERH Datum: 1983-08-25

RAPPORT 83.73 Pr.nr. 505.0620

Onderwerp: Bepalen van de titer, werkverdunning en de specificiteit van de DES antisera RIV H143280, RIV H143281 en RIV H143282.

Verzendlijst: direkteur, direktie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (8x), afdeling Normalisatie (Humme), Projektbeheer, Projektleider, direktie RIV

8373

Afdeling SERH Datum: 1983-08-25

RAPPORT 83.73 Pr.nr. 505.0620

Projekt: Ontwikkeling methoden naar het aantonen en bepalen van hormonen.

Onderwerp: Bepalen van de titer, werkverdunning en de specificiteit van de DES antisera RIV H143280, RIV H143281 en RIV H143282

Doel:
Enige eigenschappen van de diethylstilbestrol antisera RIV no. H143280, RIV no. H143281 en RIV no. H143282 vast te stellen.

Samenvatting:
Van de drie antisera worden antiserum-titratiecurven gemaakt om de titer en werkverdunning te bepalen.
Om de specificiteit vast te stellen, werd een reeks verbindingen die mogelijk met de DES antisera zouden kunnen kruisreageren in opklimmende concentratie geincubeerd met de drie antisera.
Door de concentratie DES die 50% B/Bo geeft te vergelijken met de concentratie van die stof die eveneens een % B/Bo geeft van 50, is het percentage kruisreaktie van die stof berekend.

Conclusie:
- De titer van de antisera is voor:
  RIV no. H143280 1:470
  RIV no. H143281 1:520
  RIV no. H143282 1:940.
- De werkverdunning ligt tussen:
  RIV no. H143280 1:470 en 1:750
  RIV no. H143281 1:520 en 1:1100
  RIV no. H143282 1:940 en 1:1400.
- Het DES antiserum no. H143282 is zeer specifiek voor diethylstilbestrol. Het kruisreageert voor 1,4% met hexestrol en <0,1% met dienestrol. Antisera RIV no. H143280 en RIV no. H143281 kruisreageren voor 12 en 12,5% met hexestrol en voor 1,2 en 1,2% met dienestrol. Estradiol, estriol, oestron, trenbolon en zeranol geven geen kruisreaktie met de genoemde antisera.

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig
Medewerkers/samenstellers: M.C.J. Berghmans, Th.H.G. Polman
Projektleider: dr W.G. de Ruig

1. Bepaling van de titer en werkverdunning van de DES antisera; RIV H143280, H143281 en H143282

1.1 Principe

Een constante hoeveelheid radio-actief gemerkt antigeen wordt geincubeerd met oplopende verdunning van het antiserum, waarna de gebonden en de vrij gebleven hormoonfrakties worden gescheiden.
Het percentage dat gebonden is, wordt uitgezet tegen de verdunningsgraad van het antiserum.

1.2 Definitie

Onder de titer van een antiserum wordt verstaan de verdunning waarbij 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt. De werkverdunning is die verdunning waarbij 40 tot 50% van de toegevoegde hoeveelheid tracer gebonden wordt, onder de omstandigheden van de later uit te voeren RIA-bepaling.

1.3 Werkwijze

De anti-DES sera no. H143280, 143281 en 143282 bevatten elk 0,5 ml onverdund serum. Ze worden bewaard bij -20°C.
Verdun 0,05 ml van elk van de onverdunde antisera met 0,02 M fosfaatbuffer van b.v. 1:2 tot 1:18000.
Neem voor elke verdunning een RIA buisje in duplo en voeg aan elk buisje 0,025 ml glycolmengsel en 0,05 ml ^{3}H-DES (± 20.000 dpm) toe.
Damp droog. Neem de droogrest op in 0,05 ml methanol abs.
Vortex 10 min en voeg 0,375 ml fosfaatbuffer aan de "monsters" toe en 0,425 ml aan ASB's. Vortex gedurende 5 min.
Voeg 50 µl antiserum in oplopende verdunning toe.
Incubeer 30 min bij 37°C en 30 min bij 4°C. Breng 0,1 ml van elk incubatiemengsel over in een plastic telflesje voor totaaltelling.
Pipetteer bij 4°C in alle buisjes 0,2 ml aktieve koolsuspensie en vortex. Incubeer 5 min bij 4°C. Centrifugeer 10 min bij 3000 rpm in een gekoelde centrifuge (4°C).
Breng van elk supernatant 0,45 ml over in een plastic telflesje voor telling van de gebonden fraktie. Pipetteer in alle telflesjes 10 ml scintillatievloeistof en meet de radio-aktiviteit in een vloeistofscintillatieteller.

1.4 Resultaten

Tabel 1.4.1. Bepaling van de titer en werkverdunning van het RIV antiserum H143280

Antiserum-verdunning	Totaal-telling		Telling gebonden fraktie		B/T	
	dpm		dpm		%	
1:3	5029	5037	14407	14103	95,7	93,5
1:90	4978	5010	11718	11260	77,8	75,1
1:360	4930	4842	9116	9324	61,7	64,3
1:900	4934	5007	6304	6525	42,7	43,5
1:1800	4975	5153	4176	4203	28,0	27,2
1:3600	4900	5229	2704	2614	18,4	16,7
1:4050	5030	4941	2345	2256	15,5	15,3
1:5400	5021	4945	2266	2443	15,1	16,5
1:6300	5171	4792	1844	1878	11,9	13,1
1:7200	5019	5006	1614	1549	10,7	10,3
1:9100	5079	5016	1490	1275	9,8	8,5
1:10800	4944	5028	1309	1211	8,8	8,0
1:12600	4952	5042	1419	1290	9,6	8,5
1:14400	5171	5033	1080	1143	7,0	7,6
1:18200	5048	4947	979	1129	6,5	7,6
ASB	5422	5222	1287	1096	7,9	7,0
(1)	(2)		(3)		(4)	

Tabel 1.4.2. Bepaling van de titer en werkverdunning van het RIV antiserum H143281

Antiserum-verdunning	Totaal-telling		Telling ge-bonden fraktie		B/T	
	dpm		dpm		%	
1:3	4926	5083	13893	13684	94,0	89,7
1:90	4931	4986	10753	10847	72,7	72,5
1:360	5024	4933	8649	8723	57,4	58,9
1:900	4779	4989	7215	7082	50,3	47,3
1:1800	5028	4845	5138	4796	34,1	33,0
1:3600	4869	4960	3448	3147	23,6	21,1
1:4050	5081	5075	3038	3036	19,9	19,9
1:5400	5127	4997	2998	2952	19,5	19,7
1:6300	4866	4929	2550	2393	17,5	16,2
1:7200	4963	5010	1843	1826	12,4	12,1
1:9100	5214	4922	1860	1767	11,9	12,0
1:10800	5217	5461	1560	1382	10,0	8,4
1:12600	5126	5150	1621	1682	10,5	10,9
1:14400	5021	5120	1345	1291	8,9	8,4
1:18200	5060	5082	1489	1289	9,8	8,4
ASB	5171	5098	1239	755	8,0	4,9
(1)	(2)		(3)		(4)	

Tabel 1.4.3. Bepaling van de titer en werkverdunning van het RIV antiserum H143282

Antiserum-verdunning	Totaal-telling		Telling gebonden fraktie		B/T	
	dpm		dpm		%	
1:3	4815	4742	13728	13596	95,0	95,6
1:90	4517	4649	10621	10843	76,2	80,0
1:360	4931	4978	10531	10787	71,2	72,2
1:900	5106	5026	8811	9115	58,4	59,5
1:1800	5170	4969	6158	6306	41,3	40,7
1:3600	5172	5142	4069	3988	26,2	25,9
1:4050	5190	5127	3665	3326	23,5	21,6
1:5400	5184	5214	2663	2591	17,1	16,6
1:6300	5121	5072	2549	2548	16,6	16,7
1:7200	5045	5448	2550	2308	16,8	14,1
1:9100	5180	5087	2222	2316	14,3	15,2
1:10800	5025	5114	1827	1837	12,1	12,0
1:12600	5128	5036	1524	1618	9,9	10,7
1:14400	5040	5144	1366	1415	9,0	9,2
1:18200	5194	5138	1398	1526	9,0	9,9
ASB	4901	5146	1490	1162	10,1	7,5
(1)	(2)		(3)		(4)	

2. Berekening

$$\% \text{ B/T} = \frac{(3) \times \frac{600}{450} \times \frac{500}{400}}{(2) \times \frac{500}{100}} \times 100$$

$$\% \text{ B/T gec} = \frac{(3) \times \frac{600}{450} \times \frac{500}{400} \times 100}{(2) \times \frac{500}{100}} - \frac{\text{ASB} \times \frac{600}{450} \times \frac{500}{400} \times 100}{\text{ASB} \times \frac{500}{100}}$$

hierin is:

(3) : telling gebonden fraktie (dpm)

600 : volume vóór afname gebonden fraktie (µl)

450 : afname gebonden fraktie

ASB : telling gebonden fraktie van de aspecifieke binding (dpm)

(2) : telling opbrengstfraktie (dpm)

500 : volume vóór afname opbrengstfraktie (µl)

400 : volume ná afname opbrengstfraktie (µl)

100 : afname opbrengstfraktie (µl)

ASB : telling opbrengstfraktie van de specifieke binding (dpm).

3. Conclusie

Uit de figuren 1, 2 en 3 blijkt dat de titer van de antisera RIV H143280, RIV H143281 en RIV H143282 resp. zijn: 1:470, 1:520 en 1:940. De werkverdunningen van deze antisera liggen tusen: 1:470 en1:750 (RIV H143280), 1:520 en 1:1100 (RIV H143281), 1:940 en 1:1400 (RIV H143282).

Figuur 1: Antiserum-titratiecurve d.d. 1983-06-10 voor RIV H143280

Figuur 2: Antiserum-titratiecurve d.d. 1983-06-10 voor RIV H143281

Figuur 3: Antiserum-titratiecurve d.d. 1983-06-10 voor RIV H143282.

4. Het bepalen van de kruisreaktiviteit van andere stoffen dan DES met de DES antisera RIV no. H143280, H143281 en H143282

4.1 Principe

Een reeks verbindingen, die mogelijk met de DES antisera een binding zouden kunnen aangaan, worden in opklimmende concentraties geincubeerd met de DES antisera. Van deze stoffen worden de % B/Bo berekend en vergeleken met % B/Bo van een DES standaardcurve.

4.2 Definitie

Onder kruisreaktie wordt verstaan in hoeverre het antiserum een binding aangaat met andere verbindingen dan het eigen antigeen.

4.3 Werkwijze

Maak voor elk antiserum duplo standaardreeksen van DES, Dienestrol, Hexestrol, Estradiol, Estriol, Oestron, Trenbolon en Zeranol in concentraties van 20-50-100-250-500-1000 pg/0,1 ml ethanol p.a. Neem bij iedere standaardreeks een nulpunt "Bo" en een blanco "ASB" mee.
Pipetteer van deze standaardoplossingen 0,1 ml in een glazen RIA buisje en voeg 0,05 ml ^{3}H-DES (in ethanol p.a., $\pm$ 20.000 dpm) en 0,025 ml glycolmengsel toe. Voor de Bo en ASB worden in eenzelfde buisjes eveneens 0,05 ml ^{3}H-DES en 0,025 ml glycolmengsel gepipetteerd en i.p.v. 0,1 ml standaardoplossing, 0,1 ml ethanol p.a. Pipetteer eveneens in 5 plastic telpotjes 0,05 ml ^{3}H-DES voor de totaaltellingen.
Damp de buisjes droog en voeg aan alle buisjes 0,05 ml methanol toe. Vortex 10 min. Voeg toe aan Bo en standaardpunten 0,375 ml RIA-buffer en aan de ASB 0,425 ml. Vortex alle buisjes 5 min.
Voeg aan de Bo en standaardpunten 0,05 ml antiserum toe, vortex en incubeer 30 min bij 37°C en 30 min bij 4°C.
Breng 0,1 ml van elk incubatiemengsel over in een plastic telflesje (opbrengsttelling).
Pipetteer bij 4°C in alle buisjes 0,2 ml aktieve koolsuspensie en vortex. Incubeer 5 min bij 4°C. Centrifugeer 10 min bij 3000 rpm in een gekoelde centrifuge (4°C).
Pipetteer van elk supernatant 0,45 ml in een plastic telflesje (boundtelling). Pipetteer in alle telflesjes 10 ml scintillatievloeistof en meet de radio-aktiviteit in een vloeistofscintillatieteller.

4.4 Resultaten

Tabel 4.4.1. DES standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143280

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3701 - 3851	86 - 89	6799 - 6868	61,0 - 59,2	100	-
20	4029 - 3904	93 - 91	5988 - 5742	49,3 - 48,8	79,6 - 78,7	19 - 18
50	3899 - 3968	90 - 92	5269 - 4836	44,9 - 40,5	71,1 - 62,8	45 - 46
100	3930 - 4076	91 - 94	3614 - 3486	30,5 - 28,4	44,0 - 40,0	91 - 94
250	3315 - 4298	77 - 99	2258 - 2792	22,6 - 21,6	29,0 - 27,0	192 - 249
500	3882 - 3988	90 - 92	1658 - 1939	14,2 - 16,1	13,0 - 16,7	450 - 460
1000	4072 - 3995	94 - 93	1509 - 1461	12,3 - 12,1	9,5 - 9,2	940 - 930
ASB	3863 - 3968	90 - 92	730 - 988	6,2 - 8,3	-	-

Tabel 4.4.2. De standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143280

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3792 - 3850	88 - 89	6733 - 6806	58,9 - 58,7	-	-
20	3524 - 3738	82 - 87	6725 - 6827	63,4 - 60,6	>100 >100	16 - 17
50	3848 - 3931	89 - 91	6932 - 6898	59,8 - 58,3	>100 99,0	44 - 46
100	3862 - 3885	90 - 90	6525 - 6530	56,1 - 55,8	94,6 - 94,0	90 - 90
250	3877 - 3822	90 - 89	6202 - 6328	53,1 - 55,0	88,7 - 92,4	225 - 222
500	3870 - 3904	90 - 91	5831 - 5942	50,0 - 50,5	82,5 - 83,5	450 - 455
1000	3801 - 3864	88 - 90	5696 - 5555	49,8 - 47,7	82,1 - 78,0	880 - 900
ASB	3937 - 3881	91 - 90	982 - 1006	8,3 - 8,6	-	-

Tabel 4.4.3. HEX standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143280

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3905 - 3684	91 - 85	6624 - 6665	56,3 - 60,1	-	-
20	3508 - 3647	81 - 85	6305 - 6415	60,0 - 58,4	89,3 - 87,1	16 - 17
50	3750 - 3845	87 - 89	6203 - 6080	54,9 - 52,5	81,1 - 77,0	43 - 45
100	3717 - 3632	86 - 84	5813 - 5798	51,9 - 53,0	76,0 - 77,8	86 - 84
250	3718 - 3832	86 - 89	5151 - 5098	46,0 - 44,2	65,8 - 62,7	215 - 222
500	3708 - 3880	86 - 90	4426 - 4622	39,6 - 39,5	52,7 - 54,7	430 - 450
1000	3792 - 3810	88 - 88	4168 - 4379	36,5 - 38,2	49,5 - 52,3	880 - 880
ASB	3899 - 3944	90 - 91	861 - 957	7,3 - 8,1	-	-

De stoffen estron, estradiol, estriol, trenbolon en zeranol vertonen geen enkele bindingsneiging met bovengenoemd antiserum.

Tabel 4.4.4. DES standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143281

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3628 - 3690	84 - 86	6589 - 6348	60,5 - 57,3	-	-
20	3742 - 3961	87 - 92	5590 - 5967	49,8 - 50,2	82,5 - 83,3	17 - 18
50	3928 - 3824	91 - 87	5137 - 5044	43,6 - 44,0	70,7 - 71,4	46 - 44
100	3935 - 4063	91 - 94	3942 - 4023	33,4 - 33,0	51,2 - 50,5	91 - 94
250	3893 - 3896	90 - 90	2438 - 2451	20,9 - 21,0	27,3 - 27,5	225 - 225
500	3960 - 3997	92 - 93	1954 - 2031	16,4 - 16,9	18,8 - 19,8	460 - 465
1000	3908 - 3946	91 - 91	1649 - 1582	14,1 - 13,4	14,3 - 13,0	910 - 910
ASB	3801 - 3907	88 - 91	763 - 758	6,7 - 6,5	-	-

Tabel 4.4.5. De standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143281

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3690 - 3858	86 - 89	6184 - 6509	55,7 - 56,0	-	-
20	3876 - 3818	90 - 89	6685 - 6260	57,2 - 54,4	>100 - 96,5	18 - 18
50	3798 - 3753	88 - 87	6371 - 6176	55,7 - 54,6	99,1 - 96,9	44 - 44
100	3871 - 3839	88 - 89	6214 - 6365	53,3 - 55,0	94,1 - 97,7	88 - 89
250	3824 - 3772	89 - 87	5937 - 6176	51,5 - 54,4	90,5 - 96,3	222 - 218
500	3831 - 3975	89 - 92	5910 - 5494	51,2 - 45,9	89,8 - 78,7	445 - 460
1000	3948 - 3828	92 - 89	5352 - 5579	45,0 - 48,4	76,9 - 83,9	920 - 890
ASB	3786 - 3788	88 - 88	968 - 831	8,5 - 7,3	-	-

Tabel 4.4.6. HEX standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143281

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3747 - 3789	87 - 88	6447 - 6430	57,3 - 56,5	-	-
20	3860 - 3823	89 - 89	6206 - 6340	53,4 - 55,1	93,1 - 96,5	18 - 18
50	3844 - 3864	89 - 90	5831 - 6006	50,4 - 51,6	86,8 - 89,4	45 - 45
100	3627 - 3716	84 - 86	5587 - 5961	51,1 - 53,2	88,4 - 92,8	84 - 86
250	3661 - 3729	85 - 86	5009 - 5134	45,4 - 45,7	76,6 - 77,2	212 - 216
500	3799 - 3753	88 - 87	4256 - 4304	37,2 - 38,1	59,6 - 61,4	440 - 435
1000	3653 - 3899	85 - 90	3632 - 3511	33,0 - 29,9	50,9 - 44,5	850 - 900
ASB	3612 - 3766	84 - 87	914 - 940	8,4 - 8,3	-	-

De stoffen estron, estradiol, estriol, trenbolon en zeranol vertonen geen enkele bindingsneiging met bovengenoemd antiserum.

Tabel 4.4.7. DES standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143282

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3916 - 3916	91 - 91	7762 - 7366	66,1 - 62,7	-	-
20	3882 - 3985	90 - 92	6639 - 6413	57,0 - 53,6	86,3 - 80,1	18 - 18
50	3956 - 3822	92 - 89	5367 - 5287	45,2 - 46,1	64,4 - 66,1	46 - 45
100	3828 - 3921	89 - 91	3886 - 3839	33,8 - 32,6	43,3 - 41,1	89 - 91
250	3848 - 3741	89 - 87	2623 - 2561	22,7 - 22,8	22,7 - 22,8	222 - 218
500	3986 - 3986	92 - 92	1862 - 2036	15,6 - 17,0	9,4 - 12,1	460 - 460
1000	4121 - 3894	96 - 90	1593 - 1556	12,9 - 13,3	4,4 - 5,2	960 - 900
ASB	4204 - 3815	97 - 88	1250 - 1272	9,9 - 11,1	-	-

Tabel 4.4.8. De standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143282

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3840 - 3928	89 - 91	7136 - 7148	61,9 - 60,6	-	-
20	3822 - 3791	89 - 88	7183 - 7304	62,4 - 64,0	>100 - >100	18 - 18
50	3833 - 3464	89 - 80	7021 - 6864	60,8 - 65,8	99,2 - >100	44 - 41
100	3599 - 3556	83 - 82	6505 - 6389	60,0 - 59,6	97,6 - 96,8	83 - 82
250	3600 - 3680	83 - 85	6340 - 6696	58,5 - 60,4	94,6 - 98,4	208 - 213
500	3676 - 3972	85 - 89	6192 - 6407	55,9 - 53,4	89,4 - 84,4	426 - 445
1000	3835 - 3755	89 - 87	6661 - 6736	57,7 - 60,0	93,0 - 97,6	890 - 870
ASB	4065 - 3882	94 - 90	1330 - 1327	10,9 - 11,4	-	-

Tabel 4.4.9. HEX standaardlijn met DES antiserum RIV no. H143282

Toegevoegde hoeveelheid DES	Totaal-telling	Opbrengst	Telling gebonden fraktie	Gebonden fraktie	B/Bo	Opbrengst toegevoegde hoeveelheid
pg/100 µl	dpm	%	dpm	%	%	pg/100 µl
Bo	3778	88	7264	64	-	-
20	3469 - 3617	80 - 84	7063 - 7380	67,6 - 67,7	>100 - >100	16 - 17
50	3486 - 3930	81 - 91	6687 - 7396	63,7 - 62,5	99,8 - 97,6	40 - 46
100	3631 - 3755	84 - 87	6401 - 6803	58,5 - 60,1	90,3 - 93,3	84 - 87
250	3791 - 3795	88 - 88	6355 - 6399	55,7 - 56,0	85,0 - 85,6	220 - 220
500	3854 - 3759	89 - 87	6044 - 6197	52,1 - 54,7	78,4 - 83,3	445 - 435
1000	3779 - 3726	88 - 86	5676 - 5655	49,9 - 41,5	74,4 - 75,3	880 - 860
ASB	3870 - 3864	90 - 90	1082 - 1089	9,3 - 9,4	-	-

De stoffen estron, estradiol, estriol, trenbolon en zeranol vertonen geen enkele bindingsneiging met bovengenoemd antiserum

5. Berekening

5.1 Berekening van het % opbrengst

$$\% \text{ opbrengst} = \frac{5 \times \text{tellingopbrengst}}{\text{totaaltelling}} \times 100\%$$

(totaaltelling = 21580 dpm) (kolom 3 tabellen 4.4.1 t/m 4.4.9).

5.2 Berekening van de teruggevonden concentratie

$$\text{toegevoegde hoeveelheid} \times \frac{\% \text{ opbrengst}}{100}$$

(kolom 7 tabellen 4.4.1 t/m 4.4.9)

5.3 Berekening van het % B/Bo

$$\% \text{ B} = \frac{\text{telling gebonden fraktie} \times \frac{600}{450} \times \frac{500}{400}}{\text{telling opbrengst fraktie} \times \frac{500}{100}} \times 100\%$$

$$\% \text{ B/BO} = \frac{\% \text{ Bs} - \% \text{ Basb}}{\% \text{ Bbo} - \% \text{Basb}} \times 100\%$$

(kolom 6 tabellen 4.4.1 t/m 4.4.9)

hierin zijn:

600/450, 500/400 en 500/100 = korrektiefaktoren voor volume-afname

% B = percentage "gebonden" fraktie

% Bs = percentage "gebonden" fraktie standaardpunt

% Basb = percentage "gebonden" fraktie blanco

% Bbo = percentage "gebonden" fraktie nulpunt

% B/Bo = percentage "gebonden" fraktie t.o.v. het nulpunt.

5.4 Uitzetten standaardcurven

Zet op logitlogpapier tegen elkaar uit, de concentratie van de teruggevonden hoeveelheid DES in pg/100 µl (x-as) en het % B/Bo (y-as). (zie de figuren 4, 5 en 6).

5.5 Berekening % kruisreaktie

Het percentage kruisreaktie van een stof wordt berekend door de concentratie DES die 50% B/Bo geeft te vergelijken met de concentratie van die stof die eveneens een % B/Bo geeft van 50.

$$\frac{\text{concentratie DES bij 50\% B/Bo}}{\text{concentratie X bij 50\% B/Bo}} \times 100\%$$

X stelt één van de gemeten verbindingen voor.

Tabel 5.5.1. Percentage kruisreaktie

Verbinding	Concentratie bij 50% B/Bo met AS			Kruisreaktie met AS		
	H143280	H143281	H143282	H143280	H143281	H143282
	pg/100 µl			%	%	%
Diethylstilbestrol (DES)	84	100	78	100	100	100
Diënestrol (DE)	7200	8600	<<	1,2	1,2	<0,1
Hexestrol (HEX)	700	800	5400	12	12,5	1,4
Estradiol (E_2)	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1
Estriol (E_3)	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1
Oestron (Ö)	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1
Trenbolon (TBOH)	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1
Zeranol (Z)	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1

In tabel 5.5.2 worden enige anti-DES sera met elkaar vergeleken. Zo is van elk antiserum de specificiteit ten opzichte van enkele steroiden weergegeven.
De antisera 0646/0647, H 143280, H143281 en H143282 zijn afkomstig van het RIV en aldaar ook opgewekt.
Antiserum Ru 254 is afkomstig van de firma Roussel Uclaf. Het % kruisreaktie van dit antiserum zoals vermeld, is volgens een opgave van de leverancier.
Nadere gegevens over het RIV 0646/0647 antiserum staan vermeld in RIKILT verslag 82.78 (bepalen van de titer, werkverdunning en de specificiteit van het DES antiserum RIV 0646/0647).
Uit de tabel blijkt dat het nieuwe RIV antiserum no. H143282 zéér specifiek is voor Diethylstilbestrol.

Tabel 5.5.2. Vergelijking verschillende anti-DES sera

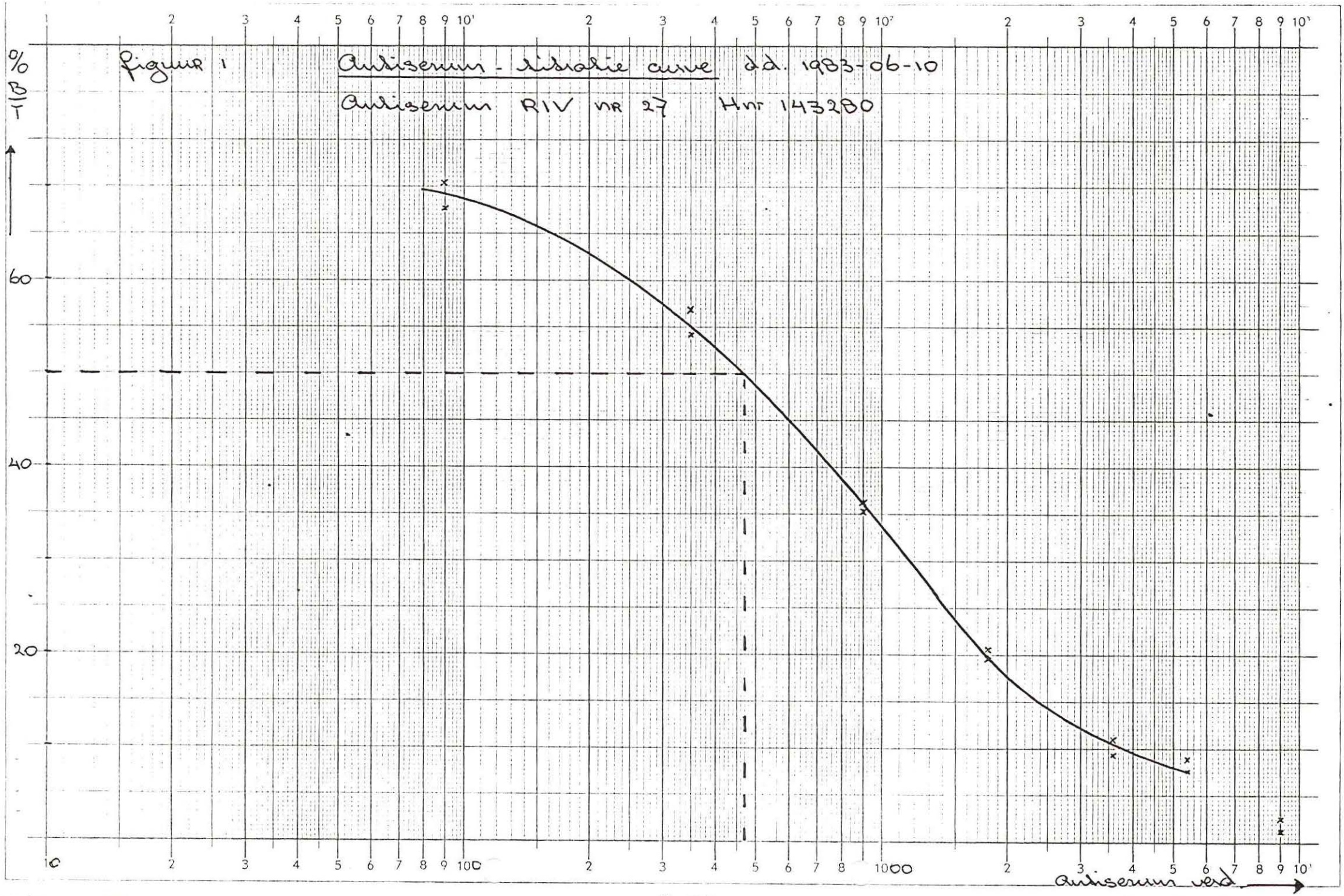
Verbinding	Concentratie bij 50% B/Bo Antiserum				Kruisreaktie Antiserum				
	RIV 0646/0647**	RIV H143280	RIV H143281	RIV H143282	RIV 0646/0647**	RIV H143280	RIV H143281	RIV H143282	RU* 254
Diethylstilbestrol	31	84	100	78	100	100	100	100	100
Dienestrol	800	7200	8600	>>	3,9	1,2	1,2	<0,1	4
Hexestrol	230	700	800	5400	13,5	12	12,5	1,4	9
Estradiol	>>	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Estriol	>>	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Oestron	>>	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Trenbolon	>>	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
Zeranol	>>	>>	>>	>>	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1

* opgave van leverancier
** RIKILT verslag 82.78

6. Conclusies

- Het RIV DES antiserum H143280 kruisreageert voor 1,2% met dienestrol en voor 12% met hexestrol.
- Het RIV DES antiserum H143281 kruisreageert voor 1,2% met dienestrol en voor 12,5% met hexestrol.
- Het RIV DES antiserum H143282 kruisreageert voor <0,1% met dienestrol en voor 1,4% met hexestrol.
  De overige bepaalde stoffen geven geen kruisreaktie met de drie antisera.
- Uit tabel 5.5.2 blijkt dat het RIV antiserum H143282 zeer specifiek is voor diethylstilbestrol.

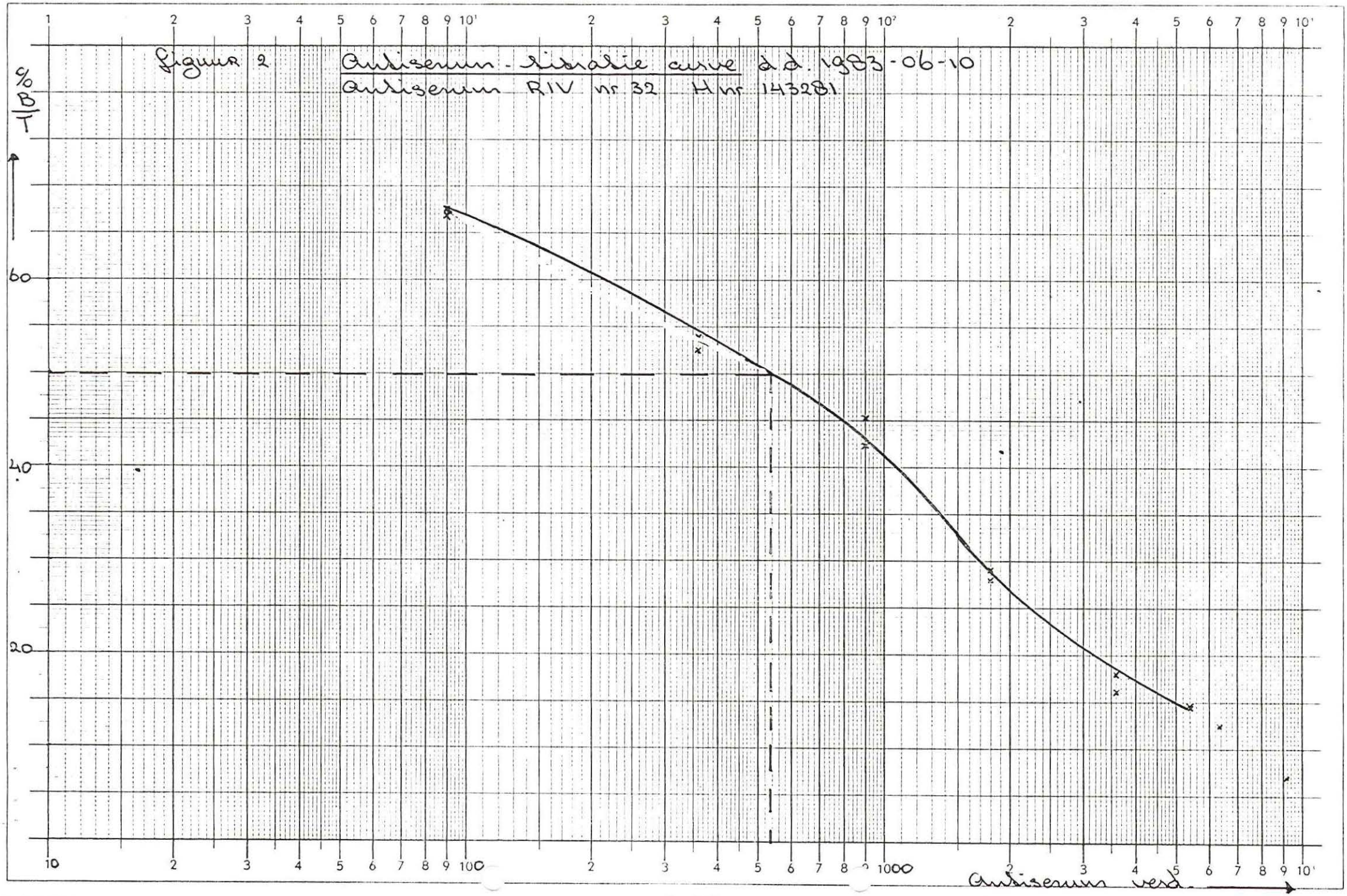
Figuur 4: Kruisreaktie met RIV As H143280
Figuur 5: Kruisreaktie met RIV As H143281
Figuur 6: Kruisreaktie met RIV As H143282.



meetpapier - wormer

No. 17 H

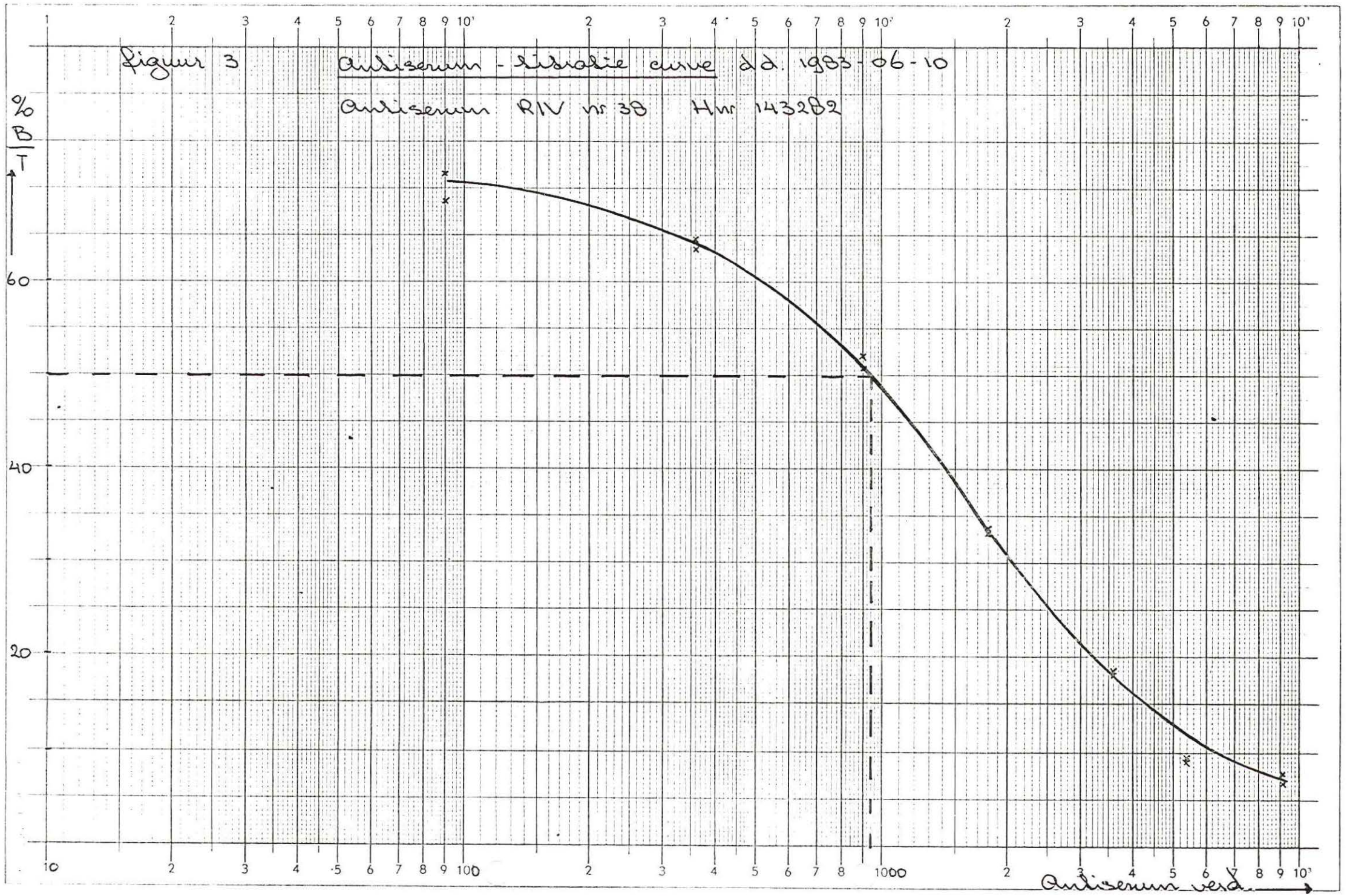
X-as log. verdeeld 1-10¹ Eenheid 90 mm. Y-as verdeeld in mm



meetpapier - wormer

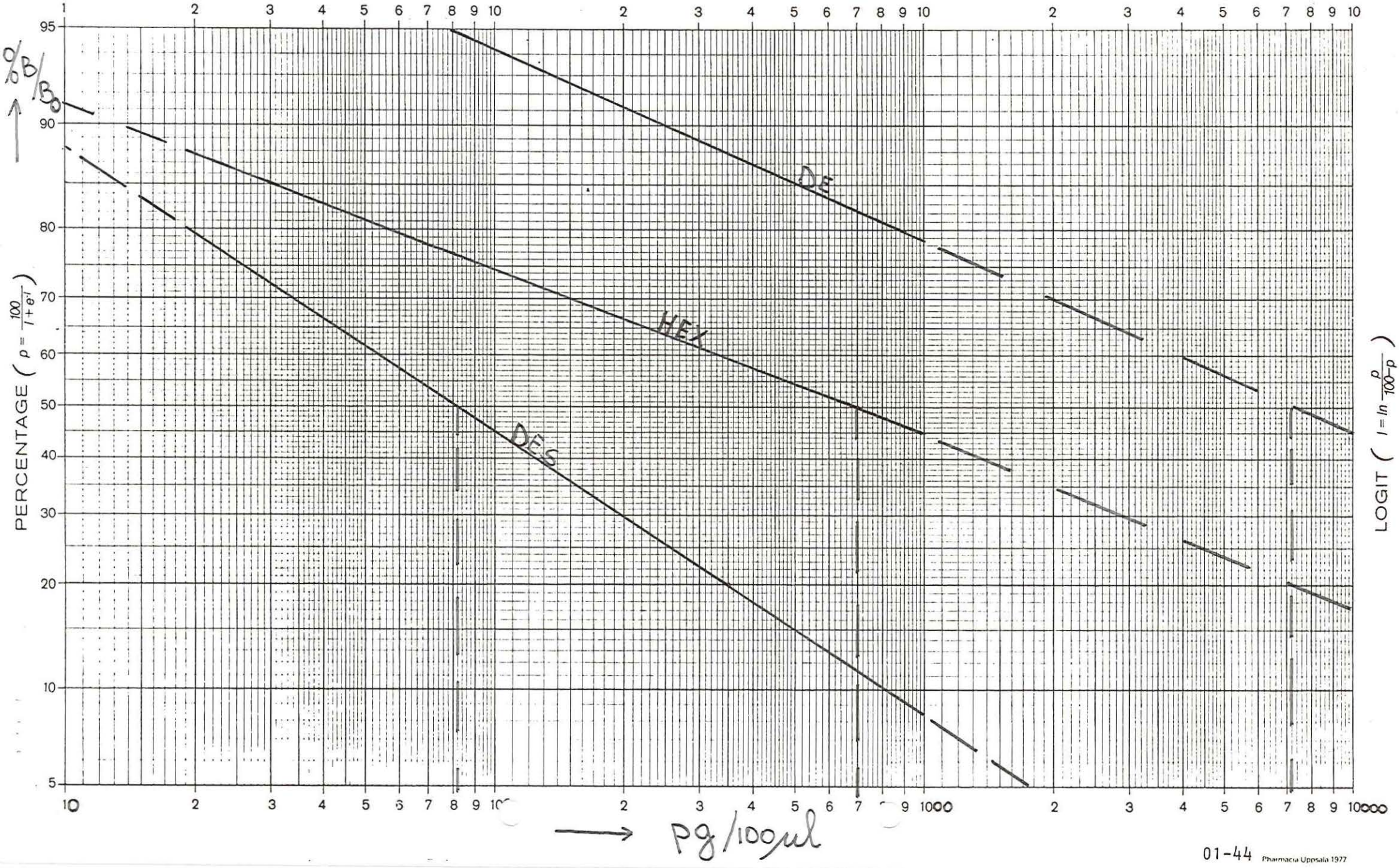
No. 17 H

X-as log. verdeeld 1-10¹ Eenheid 90 mm. Y-as verdeeld in mm.

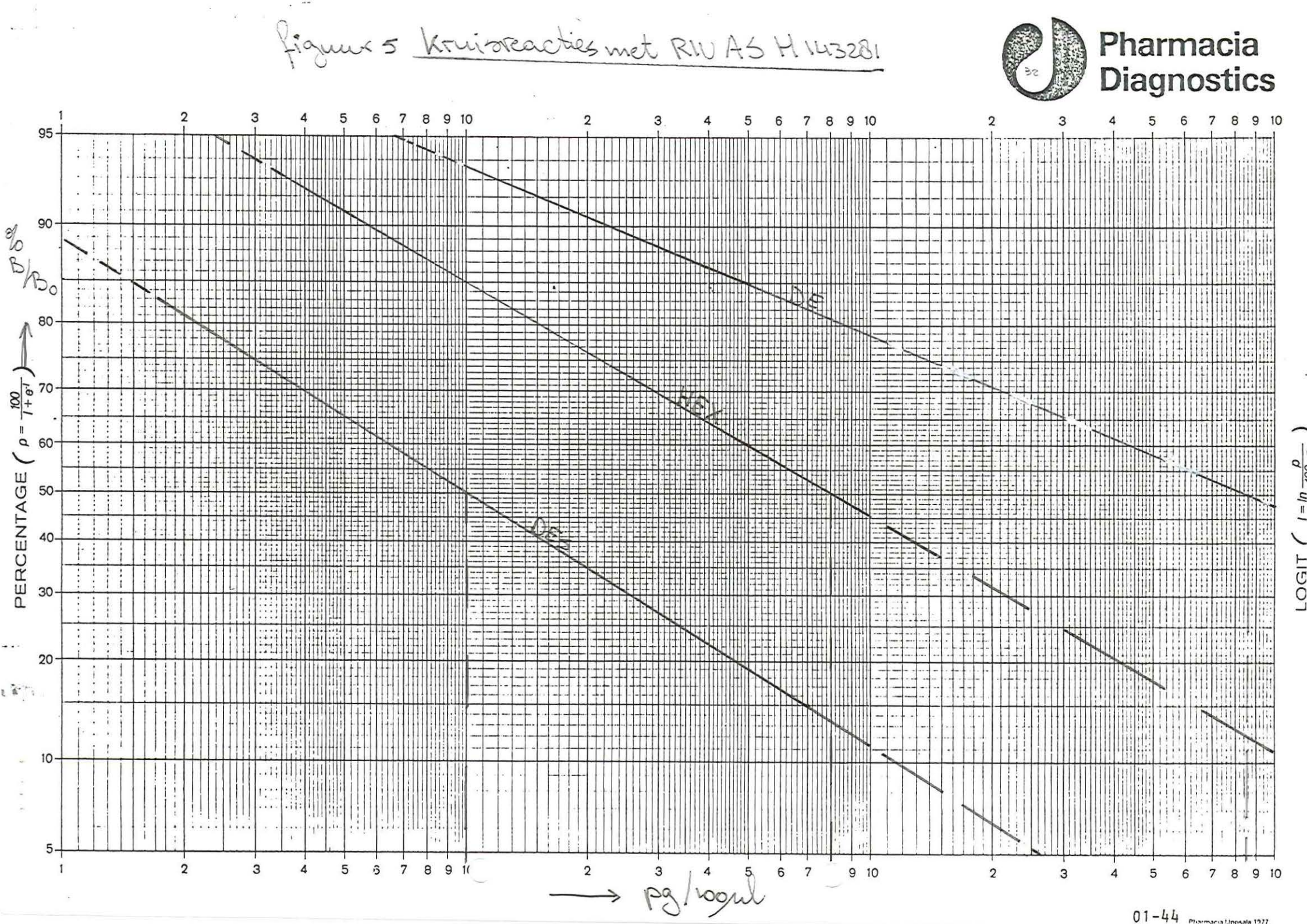

Figuur 3
Antiserum - titratie curve dd. 1983-06-10
Antiserum RIV nr 38 Hnr 143282
% B/T
60
40
20
10
100
1000
Antiserum verd.

figuur 4 Kruisreactiesmet RIU AS H 143280

Pharmacia Diagnostics



Figuur 5 Kruisreacties met RIA AS H 143281



figuur 6 Kruisreacties met RIA AS H 143282

