

## INTENCIÓN DE USO

El kit Estradiol (E2) ELISA se utiliza para la detección por ensayo Inmunoenzimático de la concentración de Estradiol en suero o plasma.

## RESUMEN

Estradiol es el estrógeno natural más potente, producida principalmente por el ovario, la placenta y en más pequeña cantidad por la corteza suprarrenal y los testículos masculinos. El estradiol es secretado en el torrente sanguíneo, donde el 98% se une a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG). La actividad estrogénica se realiza a través de complejos de estradiol-receptor que desencadenan la respuesta apropiada en el hígado y la piel. En mujeres no embarazadas con ciclos menstruales normales, la secreción de estradiol, sigue un patrón cíclico, bifásica, con la más alta concentración que se encuentra inmediatamente antes de la ovulación. Durante el embarazo, los niveles maternos de estradiol aumentan considerablemente, muy por encima de los niveles máximos pre-ovulatorios los altos niveles se mantienen durante todo el embarazo. El suero de las mediciones de estradiol es un índice de valor en la evaluación de una serie de disfunciones menstruales, tales como la pubertad precoz o retrasada en las niñas y amenorrea primaria y secundaria, y la menopausia. El nivel de estradiol se ha informado que se incrementa en pacientes con síndromes de feminización, ginecomastia y tumores testiculares. En los casos de fertilidad, las determinaciones de estradiol son útiles para controlar la inducción de la ovulación después de un tratamiento

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El Estradiol (E2) es un ensayo de competición en fase sólida (ELISA) entre las muestras y el conjugado enzimático de estradiol añadido a los pozos sensibilizados con anticuerpos policlónales (anti-Estradiol). Durante la incubación, los micro pozos sensibilizados con anticuerpos anti-E2 son incubados con E2 estándar, controles, muestras y conjugado enzimático de E2 a temperatura ambiente por 60 minutos. El estradiol de los pacientes compete con la estradiol de la enzima conjugada por los sitios de unión. El conjugado enzimático de E2 unido al micro pozo decrece progresivamente en tanto aumenta la concentración de E2 de la muestra. El estradiol y la enzima de estradiol conjugada que no se haya unido son desechados en el lavado con solución buffer. Al agregar el sustrato la intensidad de la coloración va a ser inversamente proporcional a la concentración de estradiol en las muestras la curva estándar es preparada relacionando la intensidad de estradiol

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anticuerpo Policlonal anti-Estradiol	12x8x1
2. Estándares de Estradiol : 6 viales	0.5 ml
3. Estradiol biotin conjugado	7.0 ml
4. Enzima conjugada concentrada (20 X), 1 vial	0.7 ml
5. Diluyente de la muestral: 1 vial (listo para su uso)	12 ml
6. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Solución de Frenado: 1 botella (listo para su uso)	12 ml
8. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 ml

## MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

## ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit a 2 - 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

## ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984
2. No pipetee con la boca. No fume, coma , o beba en el área donde maneje este equipo
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este puede dar datos no válidos.

## RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8° C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20° C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **Enzima conjugada (20x):** prepare una solución de trabajo 1x a 1:20 con el diluyente de muestra. Ejemplo: 0.1 ml de enzima conjugada concentrada con 1.9 ml de diluyente de la muestra.
2. **Buffer de lavado:** Prepare una solución de lavado 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml 20 X) a 475 ml de agua destilada o desionizada.
3. Conserve a temperatura ambiente.

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C) antes de su uso.
2. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los micropocillos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
3. Dispensar 25 µl de los estándares control y muestras en los micropocillos designados.
4. Dispensar 50 µl del conjugado biotin estradiol
5. Mezclar suavemente po 20 seg
6. Incubar a temperatura ambiente por 45 minutos
7. Agregar 100µl de la solución de trabajo de enzima conjugada en cada pozo.
8. Mezcle suavemente los pozos en agitador aprox. 10-20 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) por 45 minutos.
10. Remueve el líquido de los pozos .Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
11. Agregue 100 µl de sustrato TMB en cada pozo. Mezcle suavemente por 10 segundos.
12. Incube a temperatura ambiente (18-25°C) por 20 minutos.
13. Frene la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo.
14. Mezclar por 30 segundos. Es importante que en este paso cambie el color azul a amarillo completamente.
15. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

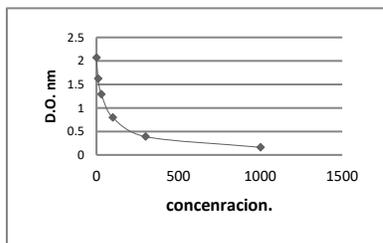
## CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcule el valor de absorbancia media (A450) para cada set de estándares, muestras y controles de referencia.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia de los estándar de estradiol en eje vertical contra la concentración de estradiol en eje horizontal en papel grafico lineal dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos leer la absorbancia de los controles y cada muestra desconocida.
3. Utilice los valores de observancia media de cada muestra para determinar la correspondiente concentración de Estradiol en pg/ml de la curva estándar.
4. Los valores obtenidos para muestras diluidas deberán ser convertidos aplicando el factor de dilución apropiado durante los cálculos.

### Ejemplo de curva standard

Estradiol (pg/ml)	OD (450 nm)
0	2.069
10	1.623
30	1.292
100	0.794
300	0.388
1000	0.162



## VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de Estradiol pueden usar rangos utilizados solo como guía:

Hombres	10 a 50 pg / ml
Mujeres	
Post- menopausia	0-30 pg / ml
ovulación	30-400 pg / ml
Folicular temprana	30/100 pg / ml
Folicular tardía	100-400 pg / ml
Fase lútea	50-200 pg / ml
Embarazo, normal hasta	35,000 pg/ml
Niños prepúberes ,normal	<10 pg / ml

## PERFORMANCE

### 1. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba es de 3.94 pg/ml. Dicho resultado surge de calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

### 2. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 60 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. La curva de regresión lineal fue calculada:  $Y=0.931 - 2.40$ ,  $r=0.979$

### 3. Precisión:

#### Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	20	29.5	2.54	8.6
2	20	143.6	12.75	8.9
3	20	198.4	13.95	7.0

#### Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coefficiente de Variación (%)
1	12	29.4	2.538	8.6
2	12	147.9	7.042	4.8
3	12	202.6	8.179	4.0

### Linealidad:

Dos diferentes muestras de pacientes fueron diluidas con el calibrador "0" en las siguientes proporciones 1:2, 1:4, 1:8. Los valores de Estradiol fueron calculados y sus resultados corregidos con el factor de dilución.

Suero	Valor Original (mIU/ml)	Porcentaje de Recupero		
		1:2	1:4	1:8
1	186.7	103.3	109.4	106.5
2	288.8	110.7	93.3	109.9

## REFERENCIAS

1. Tsang, B.K., Armstrong, D.T. and Whitfield, J.F., Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro, J. Clin. Endocrinol. Metab. 1980; 51: 1407-1411.
2. Gore-Langton, R.E. and Armstrong, D.T., Follicular steroidogenesis and its control. In: Knobil, E., and Neill, J. et al., Ed. The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York; 1988: 331-385.
3. Hall, P.F., Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. In: Knobil, E., and Neill, J. et al., Ed. The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York; 1988: 975-998.
4. Siiteri, P.K., Murai, J.T., Hammond, G.L., Nisker, J.A., Raymoure, W.J. and Kuhn, R.W., The serum transport of steroid hormones, Rec. Prog. Horm. Res., 1982; 38: 457-510.
5. Baird, D.T., Ovarian steroid secretion and metabolism in women. In: James, V.H.T., Serio, M. and Giusti, G., Eds. The Endocrine Function of the Human Ovary. Academic Press, New York; 1976: 125-133.