

INTENCIÓN DE USO

El kit Estriol Libre ELISA se utiliza para la medición cuantitativa de Estriol Libre en suero o plasma.

RESUMEN

El Estriol (Estra-1, 3, 5 (10)-trieno-3, 16, 17-triol) es uno de los tres estrógenos más importantes producidos naturalmente durante el embarazo. Los niveles de Estriol en la madre, por sí solos y en combinación con hCG y AFP, se recomiendan para monitorear el estado del feto. Durante el embarazo, la producción de Estriol depende de que la unidad materno-fetal-placenta se encuentre intacta. La producción fetal-placental de Estriol conduce a un aumento progresivo de los niveles de Estriol circulante en la madre, alcanzando un pico gestacional tardío, con una magnitud dos o tres veces mayor que en niveles de mujeres no embarazadas. En la circulación de la madre, el Estriol se somete a una conjugación rápida en el hígado, seguida de una excreción urinaria con una vida media de aproximadamente 20 minutos. Por lo tanto, los niveles de Estriol materno pueden proporcionar una estimación dinámica de las tasas de producción fetales. En términos de actividad estrogénica, el Estriol es mucho menos potente que el Estradiol. Debido a que las concentraciones de Estriol están sujetas a variaciones diurnas y episódicas, es una práctica común referir las mediciones de suero a una línea de base, definida para el paciente, ya sea como la media, o la más alta, en sus tres últimos resultados de Estriol.

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Estriol Libre es un método ELISA de fase sólida competitiva. Las muestras, controles y estándares con incubados con conjugado enzimático de Estriol en micro pozos recubiertos con anticuerpo anti-Estriol. El Estriol Libre en el suero del paciente compite con el Estriol del conjugado enzimático por los sitios de unión. Las proteínas y conjugado enzimático no unidos son lavados por la solución de lavado. Luego de la adición del sustrato, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de Estriol Libre en las muestras. Se prepara una curva estándar en relación a la intensidad del color y la concentración de Estriol Libre.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con anticuerpo Anti-Estriol	12x8x1
2. Estándares de Estriol: 6 viales (listos para usar)	0.5 ml
3. Controles Alto y Bajo: 2 viales (listos para usar)	0.5 ml
4. Anti-E3	7 ml
5. Conjugado Enzimático: 1 frasco (listo para usar)	7 ml
6. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para usar)	12 ml
7. Solución de Frenado: 1 frasco (listo para usar)	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 cuadriculado.

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 apearse 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 pueden 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

BUFFER DE LAVADO: Agregue agua destilada o desionizada a 40X de Solución de Lavado Concentrada. Diluya 30 ml de Solución Concentrada en 1,170 ml de agua destilada o desionizada, alcanzando un volumen total de 1200 ml. La solución diluida se mantendrá estable por dos semanas 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. Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.
2. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
3. Dispensar 10µl de los estándares de Estriol, controles y muestras en los pozos designados.
4. Agregar 100µl del conjugado enzimático en cada pozo.
5. Incube a temperatura ambiente (18-25° C) por 60 minutos.
6. Remueva el líquido de los pozos. Lave en cuatro tiempos con 300 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Agregue 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
8. Incube a temperatura ambiente (18-25° C) por 30 minutos.
9. Frene la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Agite gentilmente.
10. Lea la densidad óptica a 450nm 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 estándar de Estriol Libre en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de chequear los valores en cada kit. Tome el ejemplo de estándar adjunto como referencia.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia de los estándares de Estriol Libre en eje vertical contra la concentración de Estriol Libre en eje horizontal en papel grafico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Utilizando el valor de absorbancia media determine la correspondiente concentración de Estriol Libre de la curva estándar.

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos por medio del test sirven únicamente como ayuda al diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procedimientos.
2. No utilice acido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

PERFORMANCE

1. Precisión:

Intra Ensayo. Fue determinada analizando 16 repeticiones de cada uno de los tres sueros, normal, alta y baja.

Suero	N	<x>±SD ng/ml	Coefficiente de Variación (%)
1	12	3.19 ±0.14	4.27
2	12	12.36±0.54	4.36
3	12	26.14±1.19	4.54

Inter Ensayo. Se determinó analizando duplicados de tres mezclas de suero en 10 pruebas por separado, utilizando la curva estándar construida para cada ejecución.

Suero	N	<x>±SD ng/ml	Coefficiente de Variación (%)
1	18	3.19±0.19	5.96
2	18	12.68±0.62	4.88
3	18	26.83±1.48	5.53

2. Sensibilidad:

El nivel más bajo de Estriol Libre evaluado fue ≤0.02 ng/ml.

3. Recupero:

Suero	Estriol Libre Endogeno ng/ml	Estriol Libre agregado ng/ml	Recupero %
1	1.47	-	-
		2.00	100.1
		7.50	108.1
		20.00	99.2
2	6.44	-	-
		2.00	95.0
		7.50	103.1
		20.00-	99.0
3	13.66	-	-
		2.00	95.8
		7.50	107.3
		20.00	101.9

4. Linealidad:

Suero	Factor de Dilución	Medido conc. g/ml	Recupero %
1	Sin Diluir	22.20	-
	1:2	11.11	100
	1:4	5.29	.1
	1:8	2.85	95.3
	1:16	1.41	102.7 101.6
2	Sin Diluir	26.80	-
	1:2	14.20	106
	1:4	6.54	.0
	1:8	3.34	97.6
	1:16	1.77	99.7 105.7
3	Sin Diluir	34.35	-
	1:2	17.81	103
	1:4	8.56	.7
	1:8	4.30	99.7
	1:16	20.8	100.1 96.9

REFERENCIAS

1. Miodovnik M, Mimouni F, Hertzberg VS, Siddiqi TA, and Tsang RC: Serum unconjugated Estriols in insulin-dependent diabetic pregnancies: normative data and clinical relevance. Am J Perinatol 5:327-333, 1988
2. Buster JE: Gestational changes in steroid hormone biosynthesis, secretion, metabolism, and action. Clin Perinatol 10:527-552, 1983.
3. Cañez MS, Lee KJ, Olive DL: Progestogens and estrogens. Infertil Reproduct Med Clin North Amer 3:59-78, 1992.
4. Levitz M, Raju U, Arcuri F, Brind JL, Vogelmann JH, Orentreich N, Granata OM, Castagnetta L: Relationship between the concentrations of Estriol sulfate and estrone sulfate in human breast cyst fluid. J Clin.