

## INTENCIÓN DE USO

El kit Estrógeno Total ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de Estrógeno Total en suero o plasma humano.

## PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Estrógeno ELISA está basado en un principio de unión competitiva entre el Estrógeno encontrado en la muestra y el conjugado Estrógeno-HRP por una cantidad constante de anticuerpos Anti-Estrógeno de conejo. En la primera incubación, los micropozos recubiertos con anticuerpos de cabra anti-Estrógeno de conejo, son incubados con 50µl de estándares de Estrógeno Total, controles y muestras del paciente; y con 100 µl del conjugado Estrógeno-HRP y con 50µl del reactivo de conejo anti-Estrógeno Total, durante 120 minutos a temperatura ambiente, con agitador. Durante la incubación, una cantidad fija de HRP-Estrógeno marcada, compite con el Estrógeno endógeno de los estándares, muestras y controles, por un número fijo de sitios de unión al anticuerpo específico de Estrógeno. Así, la cantidad de conjugado Estrógeno-HRP inmunológicamente unido al micropozo decrece progresivamente, mientras que la concentración de Estrógeno Total en la muestra aumenta. El conjugado no unido es retirado y los micropozos lavados. Seguidamente, se agregan 100µl de solución TMB y se incuba a temperatura ambiente por 30 minutos, resultando en una coloración azul. Dicha coloración es interrumpida con la adición de 50µl solución de frenado y la absorbancia es medida y se lee con un espectrofotómetro a 450 nm.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anti-IgG-Conejo de Cabra	12x8x1
2. Estándares: 7 viales (listos para su uso)	0.25 ml
3. Conjugado de Estrógenos-HRP (20x) : 1 frasco (listo para su uso)	0.7 ml
4. Diluyente de muestra: 1 frasco (listo para su uso)	12ml
5. Reactivo Anti Estrógeno Total Ab	7 ml
6. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Solución de Frenado: 1 frasco (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.
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 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 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. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
4. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.

## EXTRACCIÓN DE LAS MUESTRAS

NOTA: Una mezcla de 3:2 Acetato de Etilo: Hexano se utiliza para extraer los estrógenos a partir de muestras de suero o plasma humano.

1. Agregue 0.2 ml de suero o plasma a un tubo de ensayo de tamaño apropiado.
2. Agregue 2 ml de la mezcla al suero o plasma.
3. Agite vigorosamente por un minuto para permitir la separación de los sólidos.
4. Transfiera la capa orgánica a un tubo de ensayo limpio y evapore mediante gas inerte (Ej. Nitrógeno).
5. Reconstituya la muestra con 1X PBS, pH 7,0. La muestra se encuentra lista para el ensayo (50µL por pozo).
6. Durante el análisis de las muestras, multiplique el resultado por el factor de dilución (10 en el siguiente ejemplo).

## PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **Conjugado Enzimático 20X.** Prepare una solución de trabajo de 1X a 1:19 con diluyente de ensayo (ej. Agregar 0.1 ml del conjugado enzimático de Estrógeno concentrado a 1.9 ml de diluyente de ensayo).
2. **Solución de Lavado 20X.** Prepare una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-26° C).

## PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26° C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previos a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8° C.
2. Dispensar 50µl de los estándares, control y muestras en los pozos designados.
3. Agregar 100µl del conjugado enzimático de Estrógeno Total en cada pozo.
4. Agregar 50µl del reactivo Anti-Estrógeno en cada pozo.
5. Cubrir e Incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 120 minutos, con agitador (600 rpm).
6. Remover el líquido de los pozos .Lave en tres tiempos con 350 µl de solución de lavado a 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
7. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
8. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (18-25° C) por 30 minutos, con agitador (600 rpm).
9. Frenar la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Agitar gentilmente por 10 segundos.
10. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 10 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 en Estrógeno Total 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 referencia en eje vertical contra su concentración en eje horizontal en papel grafico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Lea la concentración (pg/ml) para controles y para cada muestra desconocida de la curva. Registre el valor de cada muestra desconocida.

### Ejemplo de Curva Standard

	OD 450 nm	Conc. µIU/mL
Std 1	2.92	0
Std 2	2.45	10
Std 3	2.14	20
Std 4	1.61	100
Std 5	1.28	200
Std 6	0.66	500
Std 7	0.36	1500

## VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local.

## LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Los resultados obtenidos en el presente análisis deben ser utilizados solo como ayuda en el diagnóstico y deben ser interpretados en relación a la historia clínica del paciente, pruebas físicas y otros procedimientos.
2. No utilice azida de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

## PERFORMANCE

### 1. Precisión:

#### Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	16	32	2.29	7.2
2	16	290.7	14.29	4.9
3	16	1104.2	43.65	3.9

#### Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media mIU/ml	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	16	33.6	2.87	8.5
2	16	295.4	17.0	5.8
3	16	1157.1	76.86	6.6

### 2. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba resulta de calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	Réplica	Media	Desvío Estándar	Media + 2SD
Zero Estándar	24	2.579	0.054	2.69

### 3. Especificidad del anticuerpo:

Compuesto	% Reactividad Cruzada
Estradiol (E2)	100
Estrone (E1)	100
Estriol (E3)	<10
Equilin	<0.3

## REFERENCIAS

1. Chernow B, Alexander R, Smallridge RC, Thompson WR, Cook D, Beardsley D, Fink MP, Lake R, Fletcher JR: Hormonal responses to graded surgical stress. Arch Intern Med 147:1273-1278, 1987.
2. Crapo L: Cushing's syndrome: A review of diagnostic tests. Metabolism 28:955-977, 1979.
3. Lee PDK, Winter RJ, and Green OC: Virilizing adrenocortical tumors in childhood. Eight cases and a review of the literature. Pediatrics 76:437-444, 1985.
4. Leisti S, Ahonen P, Perheentupa J: The diagnosis and staging of hypocortisolism in progressing autoimmune adrenalitis. Pediatr Res 17:861-867, 1983.
5. Stewart PM, Seckl JR, Corrie J, Edwards CRW, Padfield PL: A rational approach for assessing the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. Lancet 5:1208-1210, 1988.
6. Watts NB, Tindall GT: Rapid assessment of corticotropin reserve after pituitary surgery. JAMA 259:708-711, 1988.