

AGENTE DE DIAGNOSTICO PARA USO IN VITRO. PARA USO DE EXCLUSIVO EN LABORATORIOS CLINICOS O DE GABINETE.

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de estradiol en suero humano.

DESCRIPCION

El ensayo está basado en el principio de enlace competitivo entre E2 en el espécimen y E2-HRP conjugado por una cantidad constante de anti-estradiol de conejo. En la incubación pocillos recubiertos con anticuerpos cabra-anti conejo que son incubados con estándar de E2, muestras de pacientes, E2-HRP conjugado y reactivo cabra-anti conejo de estradiol a temperatura ambiente. Durante la incubación una cantidad fijada de HRP-E2 etiquetado, compite con el E2 endógeno en el estándar, muestras para un numero fijado de sitios de enlace para el anticuerpo E2 específico. Así la cantidad de peroxidasa E2 conjugado inmunológicamente adherido al pocillo disminuye progresivamente mientras que la concentración de E2 en el espécimen aumente.

RESUMEN Y APLICACIÓN

El estradiol (E2) es una forma del estrógeno, una hormona sexual femenina producida por los ovarios. El estradiol tiene dos grupos hidroxilo en su estructura molecular. Esta hormona esteroidea tiene un peso molecular de 272.4 Daltons. El E2 es secretado a la sangre, donde el 98% de él circula unido a SHBG (globulina de unión a hormonas sexuales). Una pequeña parte de él está unido a otras proteínas del suero como a la albumina.

El E2 es responsable del crecimiento del útero, las trompas de Falopio y la vagina. También promueve el crecimiento del pecho y el crecimiento de los genitales externos. La hormona juega un papel en la distribución de la grasa corporal en las mujeres y detiene el proceso de aumento de estatura. En mujeres sexualmente maduras, es producido mayormente por los ovarios y en pequeñas cantidades por las glándulas adrenales. El estrógeno es también producido por la placenta durante el embarazo. Hombres sexualmente maduros tienen niveles mucho más bajos de E2, los cuales son producidos por los testículos y las glándulas adrenales.

En mujeres no embarazadas con ciclos menstruales normales, la secreción de E2 sigue un patrón cíclico bifásico con la concentración más alta encontrada inmediatamente antes de la ovulación. Durante el embarazo, los niveles de E2 en el suero materno se incrementan considerablemente. En casos de infertilidad, la medición de E2 en suero es útil para monitorear la inducción de la ovulación siguiendo el tratamiento con, por ejemplo, citrato de clomifero, LH-RH (hormona liberadora de LH), o gonadotropinas exógenas. Los niveles de E2 afectan el funcionamiento de los ovarios seriamente. Esto puede causar problemas menstruales, incluyendo sangrado anormal o pérdida de periodos. La prueba E2 también puede ser usada en niños o niñas para verificar el daño o enfermedad de los testículos, ovarios o glándulas adrenales.

CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pruebas:

1. Enzima conjugada 2 viales con 6 ml.
2. Reactivo anti-estradiol 5.5 ml.
3. 5 calibradores con 1 ml: 0 pg/m., 30 pg/ml, 100 pg/ml, 300 pg/ml y 1000 pg/ml.
4. Sustrato A 6 ml.
5. Sustrato B 6 ml.
6. Control 1 y 2 liofilizado.
7. PBS-T en polvo (2 bolsas 5 g.).
8. 1 bolsa zip-lock.
9. 2 piezas de papel auto-adherible.
10. Instructivo de uso.

MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión y puntas, 0.025 mL, 0.05mL, 0. 1mL.
2. Agua destilada.
3. Tubos de vidrio o frascos para mezclar sustrato A y B.
4. Vórtex mezclador.
5. Papel absorbente o una toalla de papel.
6. Papel para gráfica logarítmica.
7. Un Luminómetro.

ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. Almacene todos los componentes a una temperatura de 2°C-8°C. No lo congele. Evitar la luz intensa.
2. Colocar los pocillos no utilizados en la bolsa zip-lock con desecante proporcionado y refrigerar de 2-8°C, condiciones en que los pozos se mantendrán estables durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.
3. Almacene los calibradores reconstituídos de 2-8°C, condiciones en que los reactivos se mantendrán estables durante 2 meses. Para usar por más tiempo los calibradores, almacene en alícuotas y congelar a -20°C, evite múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento.
4. Selle y devuelva todos reactivos no utilizados a 2-8°C, condiciones en que se mantendrá la estabilidad durante 2 meses, o hasta la fecha de caducidad marcada, lo que ocurra primero.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse usando técnicas estándar de venopunción y el suero debe ser separado de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible. Evite hemólisis, lipemia o turbidez excesiva en las muestras.
2. Las muestras deberán ser niveladas y se pueden almacenar hasta 48 horas de 2-8°C, antes del ensayo. Los especímenes retenidos por un tiempo más largo pueden ser congelados a -20°C. Los especímenes deben ser mezclados antes de la prueba.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Llevar los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso durante al menos 30 minutos. Mezclar todos los reactivos por inversión suavemente o girando antes de su uso. No provocar la formación de espuma.
2. Ajustar la incubadora a 37 grados.
3. Para preparar Buffer de Lavado: añadir una bolsa de PBS-T en Polvo a 500 ml de agua destilada y mezclar. El buffer de lavado es estable a temperatura ambiente durante dos meses.
4. Determinar la cantidad de la solución de sustrato necesario y preparar mezclando volúmenes iguales de sustrato A y B en un recipiente limpio. Por ejemplo, añadir 1 ml de sustrato A y 1 ml de sustrato B por 2 tiras de ocho pocillos (quedara un ligero exceso de material preparado). Deseche la porción no utilizada si no se utiliza dentro de 20 minutos después de la mezcla.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos a dispensar. Agregue 25 µl de estándares, muestras y controles en los pocillos apropiados.
2. Dispensar 100 µl de Enzima Conjugada a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 30 segundos.
3. Dispensar 50 µl de reactivo Anti-Estradiol a cada pocillo. Mezclar suavemente durante 30 segundos
4. Cubrir la placa con el papel adherente, incubar a 37°C durante 60 minutos.
5. Descarte el contenido de la placa en un recipiente de residuos por decantación o aspiración. Enjuague los pocillos 5 veces con 350 µl de solución PBS de lavado. Golpee los pozos enérgicamente sobre papel absorbente para eliminar las gotas de agua residual
6. Añadir 100 µl de la mezcla de sustrato A y B a cada pocillo y mezclar por 10 segundos.
7. Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad 5 minutos sin agitar y leer los valores de RLU con un Luminómetro.

NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. La insuficiencia de lavado se traducirá en una mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
2. Se recomienda que no más de 32 pozos sean utilizados para cada ensayo si el pipeteado es manual, ya que los especímenes y los controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pocillos puede utilizarse si el pipeteado es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y especímenes, aunque no es obligatorio, se recomienda.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Registre los RLU's obtenidos. Calcule la media de RLU's de todas las mediciones por duplicado que se hayan hecho y utilícelas para el siguiente cálculo. Grafique los RLU's contra las concentraciones en pg/mL de cada calibrador. Una los puntos graficados con una línea delgada. Si usa una computadora, seleccione el método de curva punto a punto con función de reducción de datos, para generar la curva de calibración. Para determinar la concentración de E2 de una muestra desconocida, localice los RLU's de cada muestra en el eje vertical (Y) del gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva y lea la concentración del eje horizontal (X) del gráfico. Si una computadora es usada, para determinar la concentración de E2, ingrese los RLU's de cada muestra y obtenga la concentración.

VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales sobre la base de población de pacientes. Los resultados mostrados abajo fueron tomados en un laboratorio con muestras de pacientes tomadas al azar.

E2(pg/ml)	RLU
0	28322
30	18681
100	11709
300	6283
1000	2279

	Intervalo de referencia (pg/mL)
Hombres	<75
Fase postmenopáusica	<60
Mujeres	
Fase folicular	30-150
Pico de medio ciclo	60-480
Fase lútea	45-250
Embarazadas	>35,000
Niños (a) prepuberes	<10

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. Resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento del ensayo se lleve a cabo con una completa comprensión del proceso y con el cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio.
2. Anticuerpos heterófilos y factores reumatoides en las muestras, pueden interferir con los resultados de la prueba. Los anticuerpos heterófilos en el suero humano pueden reaccionar con las inmunoglobulinas del reactivo, interfiriendo con los inmunoensayos in vitro. Pacientes expuestos rutinariamente con animales o productos de suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y pueden ser observados valores anormales. Información adicional puede ser requerida para el diagnóstico. Este tipo de muestras no son adecuadas para ser probadas por este ensayo.

PERFORMANCE

1. Sensibilidad analítica:

Definida como la concentración correspondiente a la media de RLU's de 10 repeticiones del calibrador A menos 2 desviaciones estándar, es de ≤ 10 pg/mL.

2. Especificidad analítica:

Este ensayo está diseñado para no tener reactividad cruzada con las sustancias mostradas a continuación a las concentraciones ahí enlistadas en una solución buffer de fosfatos con BSA.

INTERFERENCIAS	CONCENTRACIÓN (ng/ml)
Testosterona	100
Progesterona	300

Este ensayo está diseñado para tener una precisión Intra-ensayo <10%. 2 sueros humanos basados en dos niveles de medición (bajo y alto) fueron probados, usando un lote de reactivo, con 20 réplicas. Los datos de este estudio fueron registrados en la siguiente tabla.

Suero	Lote	n	Media	SD	%CV
Bajo	1	20	88.72	5.01	5.65
Alto	1	20	543.93	18.42	3.39

Este ensayo está diseñado para tener una precisión inter-ensayo de <15%. 2 sueros humanos basados en dos niveles de medición (bajo y alto) fueron probados, usando 3 lotes de reactivos, con 2 réplicas, una vez por día a través de 20 días de prueba. Los datos de este estudio fueron registrados en la tabla a continuación.

Suero	n	Media	SD	CV%
Bajo	120	55.93	6.61	11.82
Alto	120	213.93	19.18	8.87

3. Medición de precisión por correlación:

Un estudio fue realizado donde las muestras fueron probadas usando este ensayo y un E2 por ELISA el cual está actualmente disponible en el mercado. Los datos fueron analizados y registrados en la tabla siguiente.

Método de correlación	Número de muestras	Intercepto	pendiente	Coefficiente correlación
Regresión lineal	180	0.089	0.9312	0.965

REFERENCIAS

1. Anderson DC. SEX-HORMONE-BINDING GLOBULIN. Clin. Endocrinol. 1974; 3(1): 69-96.
2. Wright JV, schliesman B. Robinson L. Comparative measurements of serum estriol, estradiol, and estrone in non-pregnant, premenopausal women; a preliminary investigation. Altern Med Rev. 1999; 4(4): 266-270.
3. Tulchinski D, Hobel CJ, Yeager E, Marshall JR. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy. I. Normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol. 1972; 112(8): 1095-1100.
4. Winters SJ, Troen P. Testosterone and estradiol are co-secreted episodically by the human testis. J. Clin Invest. 1986; 78(4): 870-873.