

Inserto Estradiol ELISA

MONOBIND, INC.
ESTRADIOL (E2)
Código de Producto: 4925-300

Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de Estradiol en suero humano o plasma por inmunoensayo de enzima en microplato.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

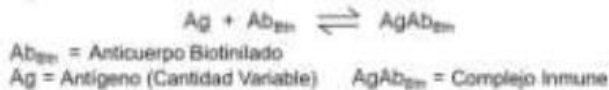
La medición de Estradiol en suero o plasma está considerado ser la forma más confiable de determinar su rango de producción. El Estradiol (17β-estradiol) es una hormona esteroide (peso molecular de 272.3 daltones), la cual circula predominantemente atada a la proteína. En adición para el estradiol, otros estrógenos esteroideos naturales incluyen estrona, estriol y otros metabolitos. Los estrógenos naturales son hormonas secretadas principalmente por los folículos ováricos y también por las glándulas suprarrenales, corpus luteum, y la placenta y, en hombres, por los testículos. Los estrógenos exógenos (natural y sintético) provocados, en diversos grados, todas las respuesta farmacológicas usualmente producidas por los estrógenos endógenos.

Las hormonas estrogénicas son secretadas en diversos rangos durante el ciclo menstrual totalmente en el periodo de actividad ovárica. Durante el embarazo, la placenta se convierte en la fuente principal de estrógenos. En la menopausia, la secreción ovárica de estrógenos disminuye en diversos rangos. Las gonadotropinas de la pituitaria anterior regula la secreción de las hormonas ováricas, estradiol y progesterona; el control hipotalámico de la producción de gonadotropina pituitaria a su vez es regulada por las concentraciones de plasma de los estrógenos y progesterona. Este complejo sistema de retroalimentación resulta en el fenómeno cíclico de ovulación y menstruación. Las determinaciones de estradiol han probado el valor en una variedad de contextos, incluidos la investigación de pubertad precoz en mujeres y ginecomastia en hombres. Su uso principal ha sido en diferenciar el diagnóstico de amenorrea y en el monitoreo de inducción de ovulación. Este kit usa un anticuerpo anti-estradiol específico, y no requiere una extracción de muestra previa de suero o plasma. La reactividad cruzada de otros ocurre naturalmente y su relación estructural de esteroides es bajo. El empleo de varias muestras de referencia de suero de concentraciones conocidas de estradiol permite la construcción de una gráfica de actividad (luz) y concentración. De la comparación de la dosis a la curva de respuesta, la actividad de un espécimen desconocido puede ser correlacionada con la concentración de estradiol.

PRINCIPIO

Inmunoensayo de Enzima Competitivo Retardado(Tipo 9):

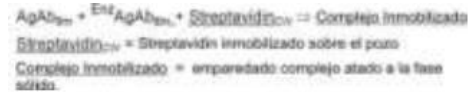
Los reactivos esenciales requeridos para un análisis Inmunoenzimométrico de enzima incluyen el anticuerpo, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Una vez mezclado el anticuerpo biotinilado, conjugado enzima-antígeno y un suero que contienen el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para un número limitado de sitios atados de anticuerpo. La interacción es ilustrada por la ecuación seguida:



Después de una corta incubación, la enzima coniuqada es añadida (Esta adición retardada permii concentración. l competencia res número limitado incubación).



Una reacción simultánea ocurre entre el biotín adjunto al anticuerpo y el streptavidin inmovilizado en el micropozo. Este afecta la separación del anticuerpo atado a la fracción después de la decantación o la aspiración. Esta interacción esta ilustrada abajo:



La actividad enzimática en la fracción de anticuerpo atado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Utilizando diversas referencias del suero de los valores conocidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEIDO

A. Referencias de Suero Humano -1ml/vial - Frascos A-G
 Siete (7) frascos de referencia del suero para estradiol en concentraciones de 0(A), 20(B), 100(C), 250(D), 500(E) 1500(F) y 3000(G) pg/ml. Almacene a 2-8°C. Se ha agregado un preservativo. Los calibradores pueden ser expresados en concentraciones Molares (nM/L) multiplicando por 2.72.
 Por ejemplo: 1pg/ml x 3.67 = 3.67 pM/L

B. Reactivo Enzima de ESTRADIOL – 6.0 ml/frasco

Un (1) frasco de Estradiol (Análogo)-Peroxidasa Horseradish (HRP) conjugada en una matriz de proteína estabilizadora, con tinte azul. Almacene a 2-8°C.

C. Reactivo Biotin de Estradiol – 6.0 ml/frasco ▼

Una (1) botella de reactivo que contiene anti-estradiol biotinilado purificado de conejo IgG conjugada en buffer, tinte amarillo y preservativo. Almacénesse a 2-8°C.

D. MICROPLATO REVESTIDO STREPTAVIDIN - 96 pozos - icono ↓

Un (1) microplato de 96 pozos cubierto con 1.0µg/ml de streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénesse a 2-8°C.

E. SOLUCION CONCENTRADA LAVADORA--20ml - icono

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénesse a 2-30 °C.

F. Reactivo de Sustrato – 12.0ml/frasco icono S_N

Un (1) frasco que contiene tetrametilbenzidina (TMB) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacén en 2-8°C.

G. SOLUCIÓN DE PARO – 7.0ml/frasco icono

Un (1) frasco que contiene un ácido fuerte (H₂SO₄) en solución.

Almacénesse a 2-8°C.

Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Evite la exposición prolongada al calor y la luz. Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO:

1. Mida con pipetas capaces de entregar los volúmenes de 25µl y 50µl con una precisión de mejor de 1.5%.
2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.350ml con una precisión de mejor de 1.5%.
3. Dispensadores ajustables para los volúmenes (200-1000µl) para los conjugados.
4. Lavador de Micro placas o una pizeta (opcional).
5. Lector de microplato con capacidad de longitud de onda a 450nm y 620 nm.
6. Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la micro placa.
7. Plástico envolvente o tapa para la micro placa para los pasos de la incubación.
8. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.
9. Contador de tiempo.
10. Materiales del control de calidad.

PRECAUCIONES

Para el Uso De Diagnóstico In Vitro No Para el Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales.

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes deben ser sangre, suero o plasma heparinizado en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras por veni-puntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra del suero de la mañana en ayuno debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo de veni-puntura de tapón rojo (con o sin aditivos de gel) o para plasma use tubos de evacuación contenidos con heparina. Permita que la sangre coagule para muestras de suero. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Evite congelar y deshelar. Cuando analice en duplicado, se requiere 0.50ml del espécimen.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

1. SOLUCION LAVADORA.

Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. El buffer diluido puede ser almacenado a temperatura ambiente (20-27°C) por no mas de 60 días.

Nota 1: No use el sustrato de trabajo si se observa color azul.

Nota 2: No use los reactivos que estén contaminados o tengan crecimiento de bacteria.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C.)

****El procedimiento del ensayo debe ser realizado por un profesional entrenado y capacitado****

1. Ajuste a formato los pozos de los micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. **Guarde los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.**

2. Mida con una pipeta 0.025 ml (25µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.

3. Agregue 0.050 ml (50µl) del reactivo Biotin de Estradiol a todos los pozos (Vea la Sección de Preparación de Reactivos).

4. Remolinar la micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar.

5. Cubra e Incube 30 minutos en la temperatura ambiente.

6. Agregue 0.050 ml (50µl) del Reactivo Enzima de Estradiol en todos los pozos.

Agregue directamente los reactivos dispensados por arriba de los pozos.

7. Remolinar la micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar.

8. Cubra e incube por 90 minutos a temperatura ambiente.

9. Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.

10. Agregue 350µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspirelo. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. **Un lavador automático o manual de placa puede ser utilizado. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.**

11. Agregue 0.100 ml (100µl) del reactivo de señal de trabajo a todos los pozos (véase la sección de la preparación el reactivo). **Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.**

NO AGITE EL PLATO DESPUES DE AÑADIR EL SUSTRATO.

12. Incube en la temperatura ambiente en la oscuridad por veinte (20) minutos.

13. Agregue 0.050ml (50µl) de solución de paro a cada pozo y mezcle gentilmente por 15-20 segundos. **Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.**

14. Lea la absorbancia a cada pozo a 450nm (usando una longitud de onda de referencia de 620-630nm. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregar la solución de paro.

Nota: Diluya las muestras que sospeche tengan concentraciones mayores a 3000pg/ml 1:5 y 1:10 con el calibrador de estradiol '0' pg/ml o suero de paciente de corridas con valor conocido mínimo de estradiol.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben de mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos

estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. En adición, la máxima absorbancia debe ser consistente con experiencias pasadas. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

CALCULO DE RESULTADOS

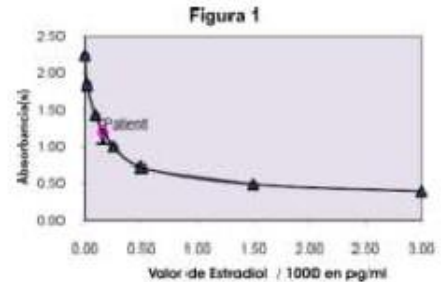
Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Estradiol en especímenes desconocidos.

1. Registre la absorbancia obtenidos del listado del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
2. Trace la Absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Estradiol en pg/ml en el papel de gráfico lineal.
3. Conecte los puntos y dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
4. Para determinar la concentración de Estradiol para un desconocido, localice el promedio de absorbancia para cada desconocido en el eje del gráfico, encuentre el punto que se interseca en la curva, y lea la concentración (en pg/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia (1.202) interseca la curva de respuesta a la dosis en (160pg/ml) la concentración de Estradiol.

EJEMPLO 1

Ident. Muestra	Pozo Numero	Abs (A)	Promedio Abs (B)	Valor (pg/ml)
Cal A	A1	2.268	2.256	0
	B1	2.244		
Cal B	C1	1.830	1.849	20
	D1	1.863		
Cal C	E1	1.405	1.420	100
	F1	1.443		
Cal D	G1	1.017	1.003	250
	H1	0.989		
Cal E	A2	0.691	0.723	500
	B2	0.749		
Cal F	C2	0.483	0.467	1500
	D2	0.493		
Cal G	E2	0.360	0.388	3000
	F2	0.385		
Pac 1	G2	1.202	1.202	160
	H2	1.203		

* Las informaciones presentadas en el Ejemplo 1 y figura 1 son ilustrativas solamente no las use para calcular sus resultados.



Nota: Multiplique los valores horizontales por 1000 para convertir en pg/ml

PARAMETROS DE CONTROL DE CALIDAD

En orden de que los resultados del ensayo sean considerados validos el siguiente criterio debe ser considerado:

1. La absorbancia (OD) del calibrador 0 pg/ml debe ser > 1.3.
2. Cuatro fuera de seis pools del control de calidad debe estar dentro de los rangos establecidos.

RIESGOS DEL ANALISIS

A. Desarrollo del Ensayo

1. Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno pozos este llevada a cabo constante para que los resultados se produzcan.
2. El pipetear las muestras no debe extender mas de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
3. No deben ser usados especímenes con lipemia alta, hemolizados o contaminados.
4. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
5. La adición del sustrato inicia una reacción cinética, la cual se termina con la adición de la solución de paro. Así pues, la adición del sustrato y la solución de

- pero deben ser agregados en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
- Los lectores de plato miden verticalmente, no toque el fondo de los pozos.
 - La falta de remover la solución adherida adecuadamente en los pasos de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
 - Utilice los componentes del mismo lote. No entre mezclase los reactivos de diferentes lotes.
 - La exactitud y precisión en el pipeteo, así como también seguir los tiempos exactos y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de estas puede caer en resultados inexactos.
 - Todos los estándares nacionales aplicables, regulaciones y leyes, incluyendo, pero no limitando, las buenas prácticas de laboratorio, deben ser seguidas estrictamente para asegurar el uso apropiado del dispositivo.
 - Es importante calibrar todo el equipo, por ejemplo las pipetas, lectores, lavadores y/o instrumentos automatizados.
 - El riesgo de análisis es requerido por la marca CE Directiva IVD 98/79/EC para este y otros dispositivos, hechos por Monobind.

B. Interpretación

- Las mediciones e interpretaciones de los resultados deben ser desarrolladas por un profesional capacitado.
- Los resultados por si solos son solo un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no debe ser usado por si solo para basarse para terapia, particularmente si los resultados conflictúan con otras determinantes.
- Para resultados válidos, controles y otros parámetros deben estar dentro de los rangos adecuados y requerimientos del ensayo.
- Si la prueba se altera, así como mezclar las partes de los diferentes kits, los cuales pueden producir falsos resultados o si los resultados son incorrectamente interpretados, **Monobind no tiene responsabilidad alguna.**
- Si la reducción de datos controlados de la computadora se utilizan para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

RANGOS ESPERADOS Y VALORES

En concordancia con los intervalos de referencia establecido para una población adulta y mujeres en gestación "normal" los rangos esperados para el Sistema de prueba por ELISA están detallados en la Tabla 1.

TABLA I
Valores Esperados para la prueba de ESTRADIOL

	Mediano	Rango
Mujeres	--	--
Fase Folicular	48	9-175
Fase Lutheal	103	44-196
Periovulatorio	209	107-281
Menopausia Tratada	122	42-289
Menopausia Sin Tratar	7,3	ND-20
Anticonceptivos Orales	13	ND-103
Hombre	19	4-94

Durante el embarazo los niveles de suero de Estradiol se incrementan rápidamente hasta el final del tercer trimestre.

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar ser encontrado por un método dado para una población de "personas-normal" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores establecidos esperados por el fabricante solamente hasta que una lata interna de la gama determinada por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CARACTERISTICAS DE ACTUACION

A. Precisión

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de Estradiol por ELISA en Micro placa fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número, el valor medio, la desviación de estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

TABLA 2
Precisión Dentro de Ensayo (valores en pg/ml)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	20	81.9	8.1	9.9%
Normal	20	242.7	20.5	8.5%
Alto	20	423.7	7.5	7.5%

TABLA 3
Precisión Entre Ensayo (valores en pg/ml)

MuestraNXg	C.V.
Bajo20106.15.1	4.8%
Normal20261.510.0	3.8%
Alto20436.713.5	8.2%

* Según lo medido en diez experimentos en duplicado

B. Sensibilidad

El Sistema de Pruebas en Microplato de Estradiol AccuBind[™] tiene una sensibilidad de 8.2 pg/ml. La sensibilidad fue comprobada determinando la variabilidad de calibrador de suero Ong/ml y usando el 2 (95% certeza) de estadística para calcular la dosis mínima.

C. Exactitud

El procedimiento de Estradiol por micro plato de ELISA fue comparado con un método de referencia de quimioluminiscencia. Fueron usados especímenes biológicos de poblaciones en niveles desde bajo, normal y alto de testosterona. (Los valores de rango desde 10pg/ml – 4300pg/ml). El número total de estos especímenes fue de 65. La ecuación de regresión del último cuadro y la correlación del coeficiente fueron computadas para el Estradiol por ELISA en comparación con el método de referencia. La información obtenida se muestra en la tabla 4.

TABLA 4
Último Cuadro

Método	Signif (x)	Análisis Regresión	Correlación Coeficiente
Este método (Y)	336.8	y=36.50+1.023*(x)	0.989
Referencia (X)	293.4		

Solo una pequeña cantidad de la referencia de diagonal entre este método y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de la regresión de la última tabla y el coeficiente de correlación indica el acuerdo excelente del método.

D. Especificidad:

El % de reactividad cruzada del anticuerpo de Estradiol para seleccionar sustancias fue evaluada agregando la sustancia que interfería a una matriz del suero en las varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis de estradiol necesaria para desplazar la misma cantidad de análogo etiquetado.

Sustancia	Reactividad Cruzada
Androstenediona	0.0003
Dihidotestosterona	0.0008
Cortisona	< 0.0001
Corticosterona	< 0.0001
Cortisol	< 0.0004
Estrilol	< 0.0001
DHEA Sulfato	< 0.0001
Estradiol	< 0.0001
Estrona	< 0.0001
Testosterona	< 0.0001

REFERENCIA

- Abraham GE. The application of natural steroid radioimmunoassay to gynecologic endocrinology. In Abraham GE, editor. *Radioassay Systems in Clinical Endocrinology*. Basel: Marcel Dekker.; 475-523 (1981).
- Balzer F. Hormonal evaluation of early pregnancy. *Fertility Sterility*, 34:1-13 (1980).
- Bauman J. "Basal body temperature: unreliable method of ovulation detection". *Fertility Sterility*, 36:729-33 (1981).
- Bergquist C, Nilius S.J, Wide L. "Human gonadotropin therapy: Serum estradiol and progesterone patterns during conceptual cycles". *Fertility Sterility*, 39:761-65 (1983).
- Gautray JP, et al. "Clinical investigation of the menstrual cycle: clinical, endometrial and endocrine aspects of luteal defects". *Fertility Sterility*, 35:296-303 (1981).
- Hensleigh PA, Fainstat T. "Corpus luteum dysfunction: serum progesterone levels in diagnosis and assessment of therapy for recurrent and threatened abortion". *Fertility Sterility*, 32:395-9 (1979).
- Hernandez JL, et al. "Direct evidence of luteal insufficiency in women with habitual abortion". *Obstetric Gynecology*, 49:705-8 (1977).
- Goldstein DI, et al. "Correlation between Estradiol and Progesterone in cycles with luteal phase deficiency". *Fertility Sterility*, 37:348-54 (1982).
- Klopper A, Fuchs F. *Progesterone*. In: Fuchs F, Klopper A, editors. *Endocrinology of Pregnancy*. Hagerstown: Harper & Row; 99-122 (1977).
- Lehmann F, Bettendorf G. "The endocrine shift from a normal cycle to anovulation". In: In: V. Bettendorf G, editors. *Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility*. Amsterdam: Elsevier/North Holland; 105-13 (1981).
- March CM. Luteal phase defects. In: Mishel DR, Davajan V, editors. *Reproductive Endocrinology, Infertility, and Contraception*. Philadelphia: F. A. Davis Company; 1979: 469-76.
- March CM, Goebelmann U, Nakamura RM, Mishel DR. Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and follicle stimulating hormone surges. *J Clin Endocrinol Metab*, 49:507-13 (1979).
- BIO-ED slide/seminar educational program. Rochester: Bioeducational Publications; 1981.
- Radwanska E, et al. "Plasma progesterone levels in normal and abnormal early human pregnancy". *Fertility Sterility*, 30:395-402 (1978).
- Tietz. *Textbook of clinical chemistry* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders; (1984).