

Immunoensayo Enzimático para la Determinación Cuantitativa de la Concentración de Estradiol (E2) en Suero o Plasma Humano

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete

Conservar entre 2°C a 8°C

NOMBRES COMUNES Y DE PROPIEDAD

Immunoensayo de la Enzima de Estradiol (E2)

USO DESTINADO

Para la determinación cuantitativa de la concentración de Estradiol (E2) en suero o plasma humano.

INTRODUCCIÓN

El Estradiol (E2) es una hormona esteroide C18 con un anillo fenólico A. Esta hormona esteroide tiene un peso molecular de 272.4. El Estradiol es el estrógeno natural más potente producido principalmente por el ovario, la placenta, y en cantidades más pequeñas por la corteza suprarrenal, y los testículos masculinos.

El Estradiol (E2) es secretado al torrente sanguíneo en donde el 98% de este circula unido a la globulina enlazante de las hormonas sexuales (SHBG). En un grado menor, este está unido a otras proteínas séricas tales como la albúmina. Solamente una pequeñísima fracción circula como hormona libre o en la forma conjugada. La actividad estrogénica es efectuada a través de los complejos receptores del estradiol los cuales desencadenan la respuesta apropiada en el nivel nuclear en los sitios previstos. Estos sitios incluyen los folículos, útero, pecho, vagina, uretra, hipotálamo, pituitaria, y en un grado menor el hígado y la piel.

En mujeres no embarazadas con ciclos menstruales normales, la secreción de estradiol sigue un patrón cíclico bifásico con la concentración más alta encontrada inmediatamente antes de la ovulación. La concentración de estradiol elevada es entendida ejercer una influencia de retroalimentación positiva en el nivel de la pituitaria en donde ésta influencia la secreción de las gonadotropinas, la hormona estimulante del folículo (FSH), y la hormona luteinizante (LH), las cuales son esenciales para la maduración folicular y la ovulación, respectivamente. Seguido de la ovulación, los niveles de estradiol bajan rápidamente hasta que las células luteales se hacen activas causando una ligera elevación secundaria y una cima de estradiol en la fase lútea. Durante el embarazo, los niveles de Estradiol en el suero materno aumentan considerablemente, más arriba de los niveles pico pre-ovulatorios y los altos niveles son mantenidos a través de todo el embarazo.

Las mediciones de estradiol sérico son un índice valioso para evaluar una variedad de desórdenes menstruales tales como pubertad precoz o retrasada de niñas y amenorrea primaria o secundaria y menopausia. Los niveles de estradiol han sido reportados ser incrementados en pacientes con síndromes afeminados, con ginecomastia y tumores testiculares.

En casos de infertilidad, las mediciones de Estradiol séricas son útiles para monitorear la inducción de la ovulación seguido de un tratamiento como por ejemplo con citrato de clomifeno, hormona liberante de LH (LH-RH), o con gonadotropinas exógenas. Durante la hiperestimulación ovárica para la fertilización *In vitro* (IVF), las concentraciones de estra-

diol séricas son generalmente monitoreadas diariamente para obtener un sincronizado óptimo de la administración de gonadotropina coriónica humana (hCG) y recolección de oocitos. Este kit esta diseñado para medir la concentración de Estradiol total en suero o plasma humano.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El E2 está basado en el principio de adherencia competitiva entre E2 en el espécimen de prueba y el conjugado de E2-HRP para una cantidad constante de anti-estradiol de conejo. En la incubación, los pozos revestidos de IgG anti-conejo de cabra son incubados con 25µl de estándares de E2, controles, y muestras de paciente, 100µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP y 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo a 37°C por 90 minutos. Durante la incubación, una cantidad fijada de E2 etiquetado de HRP compete con el E2 endógeno en el estándar, muestra, o suero de control de calidad para un número fijo de sitios de adherencia del anticuerpo de E2 específico. Así, la cantidad de conjugado de peroxidasa de E2 inmunológicamente adherida al pozo disminuye progresivamente conforme la concentración de E2 en el espécimen aumenta.

El conjugado de peroxidasa de E2 no adherido es después removido y los pozos son lavados. Después, una solución de TMB es agregada e incubada a temperatura ambiente por 20 minutos, provocando el desarrollo de un color azul. El desarrollo del color es frenado con la adición de 1N HCl, y la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 450nm. La intensidad del color formada es proporcional a la cantidad de enzima presente y está inversamente relacionada con al cantidad de E2 no etiquetado en la muestra. Una curva estándar es obtenida al trazar la concentración del estándar contra la absorbancia.

La concentración de E2 de las muestras y controles que corren concurrentemente con los estándares pueden ser calculados con la curva estándar.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba:

1. Placa de micropozos cubiertos con IgG de Cabra Anti-Conejo, con 96 pozos
2. Estándares de referencia de Estradiol: 0, 10, 30, 100, 300, y 1000 pg/mL, Líquido, listos para su uso.
3. Reactivo Anti-Estradiol de Conejo. 1 Frasco
4. Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP. 1 Frasco
5. Reactivo TMB (un solo paso). 1 Frasco
6. Solución de Paro (1N HCl). 1 Frasco
7. Solución Búfer de lavado concentrado (50x). 1 Frasco

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión 20 - 50 µL, 100 µL, 200 µL y 1.0 mL.
2. Puntas para pipetas desechables.
3. Agua destilada o desionizada
4. Mezclador Vórtex o equivalente.
5. Papel absorbente o toalla de papel
6. Papel cuadrículado
7. Un lector de MicroElisa.

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas



RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL ESPÉCIMEN

1. Suero o plasma con EDTA pueden ser utilizados. Ningún pre-tratamiento especial de muestra es necesario.
2. Muestras de suero o plasma humano deben ser almacenadas de 2 a 8°C por hasta 24 horas, y deben ser congelados a -10°C o más, bajo para periodos más largos. No utilice muestras excesivamente lipémicas o hemolizadas.
3. *Nota:* Las muestras que contienen azida sódica no deben ser utilizados en el ensayo.

ALMACENAMIENTO DEL EQUIPO DE PRUEBA E INSTRUMENTACIÓN

Los equipos de prueba sin abrir deben ser almacenados de 2-8 °C al ser recibidos y la microplaca debe ser guardada en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. Los equipos de prueba abiertos permanecerán estables hasta su fecha de caducidad, siempre y cuando sean almacenados como se describió anteriormente. Un lector de placa de MicroElisa con una amplitud de banda de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-3 DO. (densidad óptica) o mayor a una longitud de onda de 450 nm es aceptable para su uso en la medición de absorbancia.

PREPARACIÓN DE REACTIVO

1. Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su uso.
2. Muestras con concentraciones de Estradiol esperadas con más de 1000 pg/mL pueden ser cuantificadas por medio de dilución con diluyente disponible con su proveedor.
3. Diluir un volumen de búfer de lavado concentrado (50x) en 49 volúmenes de agua destilada. Por ejemplo, diluir 15 mL de búfer de lavado concentrado (50x) en 735 mL de agua destilada para preparar un volumen final de 750 mL de búfer de lavado (1x). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegure el número deseado de pozos cubiertos en el soporte.
2. Agregue 25 µL de estándares, muestras, y controles en los pozos apropiados.
3. Agregue 50 µL de reactivo anti-Estradiol de conejo en cada pozo.
4. Agregue 100 µL de Reactivo de Conjugado de Estradiol-HRP en cada pozo.
5. **Mezcle completamente por 30 segundos. Es muy importante mezclar totalmente.**
6. Incube a temperatura ambiente (18 - 22°C) por 90 minutos.
7. Enjuague y sacuda suavemente los pozos 5 veces con solución búfer.
8. Agregue 100 µL de Solución TMB en cada pozo. Mezcle cuidadosamente por 10 segundos.
9. Incube a temperatura ambiente por 20 minutos.
10. Detenga la reacción agregando 100 µL de Solución de Paro a cada pozo.
11. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante asegurarse que el color azul cambie a color amarillo completamente.**
12. Lea la absorbancia a 450 nm con un lector de MicroElisa **dentro de un plazo de 15 minutos.**

Nota importante: El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede afectar la precisión y elevar falsamente la absorbancia.

CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule el valor de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, controles, y muestras.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida

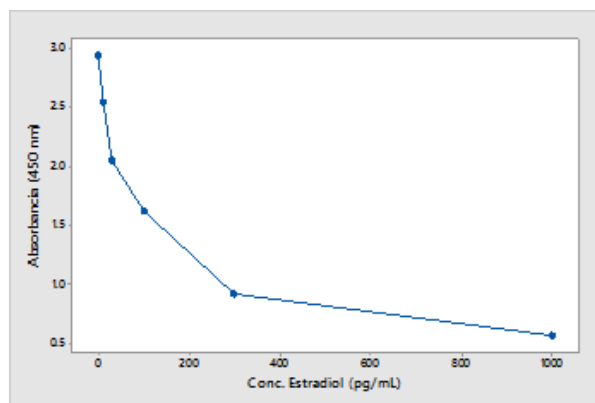
para cada estándar de referencia comparada con su concentración en pg/mL sobre un papel cuadrícula, con valores de absorbancia sobre el eje Y o vertical y las concentraciones sobre el eje X u horizontal.

3. Utilizando los valores de absorbancia media para cada muestra, determine la concentración correspondiente de Estradiol en pg/mL desde la curva estándar.
4. Cualquier valor obtenido para las muestras diluidas debe ser adicionalmente convertido al aplicar el factor de dilución apropiado en los cálculos.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje Y contra las concentraciones de Estradiol mostradas en el eje X. **Nota:** Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada laboratorio debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

Estradiol (pg/mL)	Absorción (450 nm)
0	2.943
10	2.551
30	2.055
100	1.624
300	0.925
1000	0.571



VALORES Y SENSIBILIDAD ESPERADOS

Cada laboratorio debe establecer su propio rango normal basado en la población de pacientes. La prueba de Estradiol EIA fue realizada en muestras clínicas de laboratorio en pacientes externos aleatoriamente seleccionadas. Los resultados de estas determinaciones son las siguientes:

	Hombres	<60 pg/mL
Mujeres	Fase postmenopausal	<18 pg/mL
	Ovulante, folicular prematuro	30 - 100 pg/mL
	Folicular tardío	100-400 pg/mL
	Fase luteal	60-150 pg/mL
	Embarazo, normal	Hasta 35,000 pg/mL
	Niñas prepubertales, normal	<10 pg/mL

SENSIBILIDAD

El nivel detectable mínimo de Estradiol en esta prueba ha sido medido por 2DS de la media del estándar cero y es estimado de 5 pg/mL.

APLICACIÓN CLÍNICA

1) Evaluación de disfunciones de menstruación:

- **Hiperestrogenismo en niñas:** Elevados E2 pueden ser usados en la evaluación de pubertad precoz en niñas. Sin embargo, se requieren artículos extensos complementarios para diagnósticos específicos.

- **Hipoestrogenismo en mujeres:** La medición de E2 es utilizada frecuentemente en la evaluación de hipoestrogenismo en casos de pubertad tardía, amenorrea primaria y secundaria y menopausia. **Las concentraciones de E2 en mujeres con hipoestrogenismo son usualmente de <30 pg/mL.**

2) Evaluación de producción excesiva de Estrogenos en mujeres: En mujeres embarazadas, las concentraciones de E2 serán de >1,000 pg/mL. En mujeres no embarazadas, estrogénos excesivos puede indicar neoplasma ovárico.

3) Monitoreo de Ovulación: E2 es medido con frecuencia para monitorear la ovulación y para que el paciente la siga durante la terapia de infertilidad. Por ejemplo, Fertilización *In vitro*.

4) Medición de estradiol en hombres: La medición de E2 es usada en diferentes diagnósticos: ginecomastia, síndrome feminizante, hipogonadismo y tumores testiculares.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. Los resultados confiables y reproducibles serán obtenidos cuando el procedimiento de ensayo sea llevado a cabo con un completo entendimiento de las instrucciones del inserto en el paquete y con acato a las buenas prácticas de laboratorio.
2. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente causará una deficiente precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
3. Las muestras de suero que contengan lipemia, hemolisis o turbidez no deberán ser usadas con ésta prueba.
4. Los resultados obtenidos del uso de este equipo de prueba deben ser utilizados solamente como una adición a otros procedimientos diagnósticos e información disponible para el médico.

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. Prag. 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.

6. McNatty, K.P., Baird, D.T., Bolton, A., Chambers, P., Corker, C.S. and McLean, H., Concentration of oestrogens and androgens in human ovarian venous plasma and follicular fluid throughout the menstrual cycle, *J. Endocrinol.*, 1976; 71: 77-85.
7. Abraham, G.E., Odell, W.D., Swerdloff, R.S., and Hopper, K., Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17 hydroxyprogesterone and estradiol-1713 during the menstrual cycle, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1972; 34: 312- 318.
8. March, C.M., Goebelsmann, U., Nakumara, R.M., and Mishell, D.R Jr., Roles of estradiol and progesterone in eliciting the midcycle luteinizing hormone and folliclestimulating hormone surges. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1979; 49: 507-513.
9. Simpson, E.R., and MacDonald, P.C., Endocrinology of pregnancy. In: Williams, R.H., ed., *Textbook of Endocrinology*. Saunders Company, Philadelphia; 1981: 412-422.
10. Jenner, M.R., Kelch, R.P., Kaplan, S.L. and Grumbach, M.M., Hormonal changes in puberty: IV. Plasma estradiol, LH, and FSH in prepubertal children, pubertal females and in precocious puberty, premature thelarche, hypogonadism and in a child with (feminizing ovarian tumor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1972; 34: 521-530. Page 4
11. Goldstein, D., Zuckerman, H., Harpaz, S., et al., Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil. Steril.*, 1982; 37: 348-354.
12. Kirschner, M.A., The role of hormones in the etiology of human breast cancer. *Cancer*, 1977; 39: 2716-2726.
13. Odell, W.D. and Swerdloff, R.S., Abnormalities of gonadal function in men. *Clin. Endocr.*, 1978; 8: 149-180.
14. MacDonald, P.C., Madden, J.D., Brenner, P.F., Wilson, J.D. and Siiteri, P.K., Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1979; 49: 905-916.
15. Fishel, S.B., Edwards, R.G., Purdy, J.M., Steptoe, P.C., Webster, J., Walters, E., Cohen, J., Fehilly, C. Hewitt, J., and Rowland, G., Implantation, abortion and birth after in vitro fertilization using the natural menstrual cycle or follicular stimulation with clomiphene citrate and human menopausal gonadotropin, *J. In Vitro Fertil. Embryo Transfer*, 1985; 2: 123-131.
16. Ratcliffe, W.A., Carter, G.D., Dowsett, M., et al., Oestradiol assays: applications and guidelines for the provision of a clinical biochemistry service, *Ann. Clin. Biochem.*, 1988; 25:466-483.
17. Tietz, N.W. ed., *Clinical/ Guide to Laboratory Tests*, 3rd Edition, W.B. Saunders, CO., Philadelphia, 1995: 216-217.
18. USA Center for Disease Control/National Institute of Health Manual, "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.
19. ICN Guide to Endocrine Testing. Diagnostic Division, ICN Biomedicals, Inc. pp. 2:15- 19..

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:

INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA