



E2-EASIA

KAP0621

LOT : 120803/2

Read entire protocol before use.

E2-EASIA

I. INTENDED USE

The DIAsource E2-EASIA is a competitive binding immunoassay for the quantitative determination of estradiol in human serum and plasma.

II. GENERAL INFORMATION

- A. **Proprietary name :** DIAsource E2-EASIA Kit
- B. **Catalogue number :** KAP0621 : 96 tests
- C. **Manufactured by :** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium.

For technical assistance or ordering information contact :
Tel : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INTRODUCTION

A. Estradiol

17-beta-estradiol (E2) is a C-18 steroid hormone (molecular weight 272.4) produced mainly by the ovary and placenta, and in small amounts by adrenals and testes. Estradiol is in equilibrium with estrone, which can be converted to estriol by the liver and placenta.

B. Clinical applications of the measurement of E2 levels

Like LH, FSH and progesterone, measurement of estradiol concentration in serum, peritoneal fluid and follicular fluid is an essential biochemical tool for the investigation of fertility, tumor and sexual diseases and disorders of hypothalamic/pituitary/gonadal axis.

For example:

- to detect the follicular phase;
- to check the effectiveness of the induction of ovulation (with ultrasound) and the level of E2 in follicular fluid. It allows normal detection or dysfunctional ovulation induction (the empty follicle syndrome may reflect a dysfunctional ovulation induction);
- to diagnose the luteinized unruptured follicle (LUF) syndrome (by the estimation of 17 beta-estradiol and progesterone levels in peritoneal fluid);
- to aid in the diagnosis of breast tumors (total estrogens – E1-E2 – and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity are significantly higher in malignant than in non malignant breast tissues);
- other areas of investigation are: premature adrenarche, gynecomastie and menopausal period.

V. PRINCIPLE OF THE TEST

E2-EASIA is an enzyme immunoassay performed in a microtiter plate. A fixed amount of estradiol labeled with horseradish peroxidase (HRP) competes with unlabeled estradiol present in calibrators or samples for a limited number of binding sites of a specific antibody. The E2-HRP-antibody complex is simultaneously fixed on the wells of the microtiter plate coated with an excess of anti-rabbit-gammaglobulins.

Neither extraction nor chromatography are required due to the high specificity of the antibody.

After 2 hours incubation at room temperature the microtiter plate is washed to stop the competition reaction.

The substrate solution (tetramethylbenzidine (TMB) – H₂O₂) is added and incubated for 30 minutes. The reaction is stopped with H₂SO₄ and the absorbance is measured at the appropriate wavelength. The amount of substrate turnover is inversely proportional to the estradiol concentration in the sample. A calibration curve is plotted and estradiol concentrations in samples are determined by interpolation from the calibration curve.

V. REAGENTS PROVIDED

Reagent	Quantity	Color Code	Reconstitution
Microtiter Plate with 96 wells coated with anti-rabbit IgG.	96 wells	blue	Ready to use
Anti-estradiol; lyophilized.	1 vial	blue	Add 6 mL distilled water
Calibrator 0 pg/mL. Contains human serum with preservatives	1 vial Lyophil.	yellow	Add 4 mL distilled water
Calibrators 1-5. Contains human serum with preservatives (see vial label for exact concentrations)	5 vials Lyophil.	yellow	Add 0.5 mL distilled water
Controls 1 and 2. Contains human serum with preservatives;	2 vials Lyophil.	silver	Add 0.5 mL distilled water
Estradiol-HRP Concentrated Conjugate. Contains phosphate buffer with preservatives	1 vial 0.5 ml	red	Pipette 0.1 mL into 1 vial of conjugate buffer
Conjugate Buffer for dilution of estradiol-HRP conjugate	3 vials 6 ml	red	Ready for use
Wash Buffer	1 vial 10 ml	brown	Dilute 2 mL in 400 mL distilled water or the vial content in 2000 mL distilled water.
Chromogen, TMB (Tetramethylbenzidine)	1 vial 1 ml	green	Pipette 0.2 mL into 1 vial of substrate buffer.
Substrate Buffer. Contains H ₂ O ₂ in acetate/citrate buffer	3 vials 21 ml	white	Ready to use
Stop Reagent. Contains 1.8 N H ₂ SO ₄	1 vial 6 ml	black	Ready to use

Note: Calibrator 0 pg/mL is recommended for sample dilutions.

VI. STORAGE AND STABILITY

- Store the kit at 2 - 8°C until expiration date printed on the kit label.
- Once opened, store the concentrated estradiol-HRP conjugate vial at 2 - 8°C. Diluted estradiol-HRP conjugate is stable for 4 hours at room temperature or 24 hours at 2 - 8°C when protected from direct exposure to sunlight.
- After reconstitution, store anti-estradiol, calibrators and controls at 2 - 8°C for 1 week maximum. For prolonged storage they must be

frozen. Three freezing-thawing cycles are allowed.

- Store the unused strips at 2 - 8°C in the closed bag containing the desiccant until expiration date.
- The concentrated wash solution is stable at room temperature until expiration date. Prepare fresh diluted wash solution each day.
- The freshly prepared substrate solution is stable for a maximum of 15 minutes at room temperature and must be discarded after use.

VII. SUPPLIES REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Microtiter plate reader capable of measurement at or near 450 nm.
2. Calibrated adjustable precision pipettes, preferably with disposable plastic tips. (A manifold multi-channel pipette is desirable for large assays.)
3. Distilled or deionized water.
4. Plate washer: automated or manual (squirt bottle, manifold dispenser, etc.).
5. Data analysis and graphing software. Graph paper: linear (Cartesian), log-log, or semi-log, as desired.
6. Calibrated beakers and graduated cylinders in various sizes.

VIII. SAFETY

- For Research Use only.
- The human blood components included in this kit have been tested and found non reactive for HBsAg and anti-HIV. Nevertheless, no known method can offer complete assurance that human blood derivatives will not transmit hepatitis, AIDS or other infections. Therefore, handling of reagents, serum or plasma specimens should be in accordance with local safety procedures, e.g., CDC/NIH Health Manual: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.
- Avoid any skin contact with H₂SO₄, H₂O₂ and TMB. In case of contact, wash thoroughly with water.
- Do not eat, drink, smoke or apply cosmetics where kit reagents are used.
- Do not pipette liquids by mouth.

IX. PROCEDURAL NOTES/LAB QUALITY CONTROL

- Do not use kit components beyond the expiration date.
- Do not mix materials from different kit lots.
- Do not mix strips from different plates.
- Bring all the reagents and specimens to room temperature (18 - 30°C) prior to use.
- Thoroughly mix the reagents and samples before use by gentle agitation or swirling.
- Use a clean disposable plastic pipette tip for each reagent, calibrator, control or specimen addition in order to avoid cross-contamination. When dispensing H₂SO₄ and substrate solution, avoid pipettes with metal parts.
- Use a clean plastic container to prepare the wash solution.
- The TMB solution in substrate buffer should be colorless. A dark blue color indicates that the reagent is unusable and must be discarded.
- During incubation with substrate solution, avoid direct sunlight on the microtiter plate.
- Follow the incubation times described in the assay procedure.
- Dispense the substrate solution within 15 minutes following the washing of the microtiter plate.

X. SAMPLE COLLECTION AND PREPARATION

- No special pretreatment of the sample is necessary. Prior to use, all the samples should be at room temperature. It's recommended to vortex the samples before use.
- Do not use hemolyzed samples.
- Serum or plasma samples must be kept at 2 - 8°C. If the test is not run within 24 hrs, storage in aliquots at -20°C is recommended. Avoid successive freezing and thawing.
- Serum, heparinized plasma or EDTA plasma provide similar results.
 $Y(\text{serum}) = 1.00 \times (\text{HEP}) - 3 \quad r = 0.99 \quad n = 48$
 $Y(\text{serum}) = 0.98 \times (\text{EDTA}) - 9 \quad r = 0.98 \quad n = 48$

XI. REAGENT PREPARATION

- Calibrators and Controls:**
Reconstitute the lyophilized calibrators and controls to the volume specified on the vial label with distilled water (4 mL for the zero calibrator and 0.5 mL for the other calibrators and controls). Allow them to remain undisturbed until completely dissolved, then mix well by gentle inversion.
- HRP-Estradiol Conjugate:**
Pipette 0.1 mL of the concentrated HRP-estradiol solution into one of the vials of conjugate buffer. Prepare immediately prior to use. Maximum stability is 4 hours at room temperature or 24 hours at 2 - 8°C when protected from direct exposure to sunlight.
- Wash Buffer:**
Dilute 2 mL in 400 mL distilled water or the content of the entire vial in 2000 mL distilled water (use a magnetic stirrer).
- Substrate Solution:**
Pipette 0.2 mL of the chromogen (TMB) into one of the vials of substrate buffer (H₂O₂ in acetate/citrate buffer). Prepare immediately prior to use. Maximum stability is 15 minutes at room temperature when protected from direct exposure to sunlight.

II. ASSAY PROCEDURE

A calibration curve must be run with each assay.

It is recommended that the assays be performed in duplicate and that instructions for the assay procedure be followed exactly to obtain reliable results.

- Select sufficient strips to accommodate calibrators, controls and all test samples.
- Fit the strips into the holding frame.
- Dispense 50 µL of each calibrator, control or sample into the appropriate wells. Vertical alignment is recommended.
- Dispense 50 µL of estradiol-HRP conjugate into all wells.
- Dispense 50 µL of anti-estradiol into each well.
- Incubate for 2 hours at room temperature on a horizontal shaker set at 700 ± 100 RPM.
- Wash the plate by:
 - aspirating the liquid from each well;
 - dispensing 0.4 mL of wash solution into each well;
 - aspirating the contents of each well. Repeat steps b) and c) 4 times.
- Dispense 200 µL of the freshly prepared substrate solution into each well immediately after the washing step.
- Incubate the plate for 30 minutes at room temperature, protecting from direct sunlight, on a horizontal shaker set at 700 ± 100 RPM.
- Dispense 50 µL of stop reagent into each well.
- Read the absorbances of each well at 450 nm (reference wavelength at 650 nm) within 1 hour after addition of stop reagent.

XIII. CALCULATIONS AND RESULTS INTERPRETATION

- Calculate the mean absorbance of duplicate determinations, rejecting obvious outliers.
- For each calibrator and sample calculate the percent bound:
 $B/Bo \times 100 = \frac{OD(\text{calibrator or sample})}{OD(\text{zero calibrator})} \times 100$
- Using either linear-linear or semi-log graph paper, plot the (B/BO x 100) values for each calibrator point as a function of the estradiol concentration of each calibrator point.
- By interpolation of the samples (B/Bo x 100) values, determine the estradiol concentrations of the samples from the reference curve.

If using curve fitting software, the four-parameter algorithm provides the best curve fit.

XIV. EXAMPLE OF TYPICAL REFERENCE CURVE

The following data are for demonstration purposes only and can not be used in place of data generated at the time of assay.

Calibrator	OD units	B/Bo x 100
0 pg/mL	1.790	100
13 pg/mL	1.424	80
50 pg/mL	1.013	57
100 pg/mL	0.762	43
270 pg/mL	0.447	25
935 pg/mL	0.221	12

XV. EXPECTED VALUES

Identification	Number of subjects	Range (pg/ml)
Males	50	10 - 45
Postmenopausal females	30	10 - 45
Ovulating females: (day 0 = LH peak)	14	
Day: - 10		13 - 80
- 4		20 - 165
- 1		73 - 410
0		119 - 417
+2		22 - 154
+5		44 - 174
+10		13 - 146
Pregnant women:		
1 st trimester	88	40 - 3100
2 nd trimester	39	1600 - 14000
3 rd trimester	100	4200 - 32000

pg/ml x 3.67 = pmol/l

pmo/l x 0.272 = pg/ml

XVI. PERFORMANCE CHARACTERISTICS

SENSITIVITY

Minimum detectable concentration (MDC) of estradiol in 10 different assays was 5 ± 2 pg/mL (mean ± SD). MDC is defined as the concentration of estradiol corresponding to 95% of maximum binding.

SPECIFICITY

The percentage of cross-reaction was estimated under physiological conditions in serum by comparison of the concentration yielding a 50% binding inhibition:

Substances	Cross-reactivity (%)
17-b estradiol	100
Estrone	2
Estriol	1.9
E2-3-Glucuronide	0.6
E2-17-Glucuronide	0.56
E2-17-Valerate	0.1
Cartisol	<0.001
Progesterone	0.03
Dhea-sulfate	<0.0001
Testosterone	<0.001
Androstenediol	<0.001
Norgestrel	0.01
Premarin	0.06
Equilin	0.1

PRECISION

Intra-assay				Inter-assay			
Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV %	Serum	N	<X> ± SD (pg/mL)	CV %
A	20	131 ± 6	4.6	C	15	101 ± 6	6.0
B	20	257 ± 10	3.9	D	15	196 ± 12	6.1

ACCURACY

Recovery				Dilution test			
Sample	Added (pg/mL)	Recovery (pg/mL)	Recovery (%)	Serum dilution	Theoretical conc. (pg/mL)	Measured conc. (pg/mL)	Recovery (%)
Serum	916	719	78.4	1/1	997	997	100
	516	430	83.3	1/2	498	485	97
	316	304	96.2	1/4	249	252	101
	166	176	106.0	1/8	125	109	87

II. BIBLIOGRAPHY

1. Abraham, G.E. (1974) Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:340-346.
2. Baird, D.T., Fraser, I.S. (1974) Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 beta and estrone in women throughout the menstrual cycle. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 38:1009-1017.
3. Haning, R.V. et al. (1985) Maternal serum progesterone, 17 Beta-estradiol and estriol are increased in pregnancies which follow treatment with human menopausal gonadotropins; effects of multiple gestation and maternal endocrine status. *J. Steroid Biochem.* 22:833-829.
4. Mehta, R.R. (1987) Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17B-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH). Activity in malignant and non-malignant human breast tissues. *Int. J. Cancer* 40:305-308.
5. Selby, et al. (1986) Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women. *Br. Med. J.* 293:1337-1339.

SUMMARY OF ASSAY PROCEDURE		
	Calibrators (mL)	Controls or samples (mL)
Calibrators	50	-
Controls-samples	-	50
Estradiol-HRP	50	50
Anti-estradiol	50	50
Incubate for 2 hours at RT with continuous shaking (700 RPM) Aspirate the content of each well Wash 5 times with 0.4 mL of wash solution and aspirate		
Substrate solution	200	200
Incubate 30 minutes at RT with continuous shaking (700 RPM)		
H ₂ SO ₄	50	50
Read the microtiter plate 450 nm (versus 650 nm)		

DIAsource Catalogue Nr : KAP0621	P.I. Number : 1700483/en	Revision nr : 120803/1
-------------------------------------	-----------------------------	---------------------------

Leer todo el protocolo antes de utilizar.

E2-EASIA

I. USO PREVISTO

El DIAsource E2-EASIA es un inmunoensayo competitivo para la determinación cuantitativa en suero y plasma humano.

II. INFORMACIÓN GENERAL

- A. **Nombre registrado:** DIAsource E2-EASIA Kit
- B. **Número de catálogo :** KAP0621 : 96 pruebas
- C. **Fabricado por:** DIAsource ImmunoAssays S.A.
Rue du Bosquet, 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica.

Para obtener asistencia técnica o información sobre pedidos póngase en contacto con :
Teléfono : +32 (0)10 84.99.11 Fax : +32 (0)10 84.99.91

III. INTRODUCCIÓN

A. Estradiol

17-beta-estradiol (E2) es una hormona esteroidea C-18 (peso molecular 272,4) producida principalmente en el ovario y la placenta y en cantidades pequeñas en las suprarrenales y los testículos. El estradiol está en equilibrio con la estrona que puede convertirse en estriol en el hígado y la placenta.

B. Aplicaciones clínicas de la medición de los niveles de E2

Tal como las mediciones de la LH, la FSH y la progesterona, la medición de la concentración de estradiol en suero, líquido peritoneal y líquido folicular es una herramienta bioquímica fundamental para la investigación de la fertilidad, enfermedades tumorales y sexuales y trastornos del eje del hipotálamo/pituitaria/gónada.

Por ejemplo:

- para detectar la fase folicular;
- para comprobar la efectividad de la inducción de la ovulación (con ultrasonido) y el nivel de E2 en el líquido folicular. Permite la detección normal o la inducción disfuncional de la ovulación (el síndrome del folículo vacío puede reflejarse en una inducción disfuncional de la ovulación);
- para diagnosticar el síndrome del folículo luteinizado no roto (LUF) (por la estimación de los niveles de 17 beta-estradiol y progesterona en el líquido peritoneal);
- para ayudar en el diagnóstico de tumores de la mama (la actividad de los estrógenos totales – E1-E2 – y 17 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa es significativamente más alta en tejido mamario maligno que no maligno);
- otras áreas de investigación son: adrenarquia prematura, ginecomastia y periodo menopáusico.

V. PRINCIPIO DE LA PRUEBA

E2-EASIA es un inmunoensayo enzimático realizado en una microplaca. Una cantidad fija de estradiol marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) compete, con estradiol no marcado presente en los calibradores o muestras, por un número limitado de sitios de unión de un anticuerpo específico. El complejo E2-HRP-anticuerpo está fijado simultáneamente en los pocillos de la microplaca recubiertos con un exceso de gammaglobulinas anti conejo.

No es necesario realizar una extracción ni una cromatografía debido a la alta especificidad del anticuerpo.

Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente se lava la microplaca para detener la reacción competitiva.

Se añade la solución de sustrato (tetrametilbenzidina (TMB) – H₂O₂) y se incuba durante 30 minutos. La reacción se detiene con H₂SO₄ y la absorbancia se mide a la longitud de onda adecuada. La cantidad de sustrato utilizado es inversamente proporcional a la concentración del estradiol en la muestra. Se traza una curva de calibración y las concentraciones de estradiol en las muestras se determina por interpolación en la curva de calibración.

V. REACTIVOS SUMINISTRADOS

Reactivos	Cantidad	Código Color	Reconstitución
Microplaca con 96 pocillos recubiertos con anti conejo IgG.	96 pocillos	azul	Listo para usar
Anti-estradiol; liofilizado.	1 vial	azul	Añadir 6 ml agua destilada
Calibrador 0 pg/ml. Contiene suero humano con conservantes	1 vial Liofil.	amarillo	Añadir 4 ml agua destilada
Calibradores 1-5. Contienen suero humano con conservantes (ver la etiqueta del vial para concentración exacta)	5 viales Liofil.	amarillo	Añadir 0.5 ml agua destilada
Controles 1 y 2. Contienen suero humano con conservantes	2 viales Liofil.	plata	Añadir 0.5 ml agua destilada
Estradiol-HRP Conjugado concentrado. Contiene tampón fosfato con conservante	1 vial 0.5 ml	rojo	Pipetear 0.1 ml en 1 vial de tampón del conjugado
Tampón del conjugado para diluir el conjugado estradiol-HRP	3 viales 6 ml	rojo	Listo para usar
Tampón de lavado	1 vial 10 ml	marrón	Diluir 2 ml en 400 ml agua destilada o el contenido del vial en 2000 ml de agua destilada.
Cromógeno, TMB (Tetrametilbenzidino)	1 vial 1 ml	verde	Pipetear 0,2 ml en 1 vial de tampón de sustrato
Tampón del sustrato. Contiene H ₂ O ₂ en tampón acetato/citrato	3 viales 21 ml	blanco	Listo para usar
Reactivo de parada. Contiene H ₂ SO ₄ 1,8 N	1 vial 6 ml	negro	Listo para usar

Nota: Se recomienda utilizar el calibrador 0 pg/ml para diluir las muestras.

VI. ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

- Almacenar el kit a 2 - 8°C hasta la fecha de caducidad impresa en la etiqueta del kit.
- Una vez abierto, almacenar el vial de conjugado de estradiol-HRP concentrado a 2 - 8°C. El conjugado estradiol-HRP diluido es estable por 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas a 2 - 8°C cuando está protegido de la luz solar directa.
- Después de reconstituir, almacenar el anti estradiol, los calibradores

y los controles a 2 - 8°C por 1 semana máximo. Para almacenaje prolongado se deben congelar. Se permiten 3 ciclos de congelación y descongelación.

- Almacenar las tiras no utilizadas a 2 - 8°C en la bolsa cerrada que contiene el desecante, hasta la fecha de caducidad.
- La solución de lavado concentrada es estable a temperatura ambiente hasta la fecha de caducidad. Preparar solución de lavado diluida fresca cada día.
- La solución de lavado recién preparada es estable por un máximo de 15 minutos a temperatura ambiente y se debe eliminar después de utilizar.

VII. MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

- Lector de microplacas capaz de leer a o alrededor de 450 nm .
- Pipetas de precisión ajustables calibradas, de preferencia con puntas plásticas desechables. (Para ensayos más grandes es preferible una pipeta multicanal)
- Agua destilada o desionizada.
- Lavador de placas automático o manual (botella de chorro o dispensador múltiple, etc.).
- Software para análisis de datos y gráficos. Papel de gráfico: lineal (cartesiano), log-log, o semi-log, según lo prefiera.
- Vasos de precipitado de varios tamaños, calibrados y graduados.

VIII. SEGURIDAD

- Solo para uso en investigación.
- Los componentes de sangre humana incluidos en este kit han sido analizados y han resultado no reactivos para HBsAg y anti-VIH. Sin embargo, no existe un método conocido que pueda ofrecer seguridad absoluta de que los derivados de la sangre humana no transmitirán hepatitis, SIDA u otras infecciones. Por lo tanto, el manejo de reactivos, muestras de suero o plasma se debe hacer de acuerdo con los procedimientos de seguridad locales, p. ej. CDC/HH Health Manual: "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" 1984.
- Evitar el contacto de la piel con H₂SO₄, H₂O₂ y TMB. En caso de contacto, lavar con abundante agua.
- No comer, beber, fumar o aplicarse cosméticos en el lugar donde se utilizan los reactivos del kit.
- No pipetear líquidos con la boca.

IX. NOTAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO/CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO

- No utilizar los componentes del kit después de la fecha de caducidad.
- No mezclar materiales de kits de diferentes lotes.
- No mezclar tiras de diferentes placas.
- Dejar que todos los reactivos alcancen temperatura ambiente (18 - 30°C) antes de utilizar.
- Mezclar muy bien todos los reactivos y muestras agitando o girando suavemente.
- Utilizar una punta de pipeta plástica desechable limpia para cada adición de reactivo, calibrador, control or muestra para evitar contaminación cruzada. Al dispensar H₂SO₄ y solución de sustrato evitar pipetas con partes metálicas.
- Utilizar un contenedor de plástico limpio para preparar la solución de lavado.
- La solución TMB en un tampón de sustrato debe ser incolora. Un color azul oscuro indica que el reactivo no se puede utilizar y se debe eliminar.
- Durante la incubación con la solución de sustrato, evitar la luz solar directa sobre la microplaca.

- Adherirse a los tiempos de incubación detallados en el procedimiento del ensayo.
- Dispensar la solución de sustrato dentro de los 15 minutos después de lavar la microplaca.

X. TOMA DE MUESTRA Y PREPARACIÓN

- No es necesario tratar las muestras antes del ensayo. Antes de utilizar, todas las muestras deben estar a temperatura ambiente. Se recomienda agitar en un Vortex las muestras antes de utilizar.
- No utilizar muestras hemolizadas.
- Las muestras de suero o plasma se deben mantener a 2 - 8°C.
- Si la prueba no se realiza dentro de las 24 horas, se recomienda almacenar en alícuotas a -20°C. Evitar ciclos de congelamiento y descongelamiento sucesivos
- El suero, plasma heparinizado o con EDTA dan resultados similares.

$$Y(\text{suero}) = 1,00 \times (\text{HEP}) - 3 \quad r = 0,99 \quad n = 48$$

$$Y(\text{suero}) = 0,98 \times (\text{EDTA}) - 9 \quad r = 0,98 \quad n = 48$$

XI. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

- **Calibradores y Controles:**
Reconstituir los calibradores y controles liofilizados al volumen especificado en la etiqueta del vial con agua destilada (4 ml para el calibrador cero y 0,5 ml para los otros calibradores y controles). Dejarlos inmóviles hasta que se disuelvan completamente, luego mezclar bien por inversión suave.
- **HRP-Estradiol Conjugate:**
Pipetear 0,1 ml de la solución concentrada de HRP-estradiol en uno de los viales del tampón de conjugado. Preparar inmediatamente antes de utilizar. La estabilidad máxima es 4 horas a temperatura ambiente o 24 horas a 2 - 8°C cuando está protegida de la luz solar directa.
- **Tampón de lavado:**
Diluir 2 ml en 400 ml de agua destilada o el contenido total del vial en 2000 ml agua destilada (utilizar un agitador magnético).
- **Solución de sustrato:**
Pipetear 0,2 ml del cromógeno (TMB) en uno de los viales de tampón de sustrato (H₂O₂ en tampón acetato/citrato). Preparar inmediatamente antes de utilizar. La estabilidad máxima es de 15 minutos a temperatura ambiente cuando está protegida de la luz solar directa.

II. PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Se debe realizar una curva de calibración para cada ensayo.

Se recomienda realizar los ensayos en duplicado y seguir las instrucciones del procedimiento del ensayo fielmente para obtener resultados confiables.

1. Seleccionar suficientes tiras para acomodar los controles, los calibradores y todas las muestras.
2. Colocar las tiras en el marco de sostén.
3. Dispensar 50 µl de cada calibrador, control o muestra en los pocillos adecuados. Se recomienda la alineación vertical.
4. Dispensar 50 µl del conjugado estradiol-HRP en todos los pocillos.
5. Dispensar 50 µl de anti-estradiol en cada pocillo.
6. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador horizontal colocado a 700 ± 100 RPM.
7. Lavar la placa:
 - a) aspirando el líquido de cada pocillo;
 - b) dispensar 0,4 ml de solución de lavado en cada pocillo;
 - c) aspirar el contenido de cada pocillo. Repetir los pasos b) y c) 4 veces.

8. Dispensar 200 µl de la solución de sustrato recién preparada en cada pocillo inmediatamente después del paso de lavado.
9. Incubar la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiéndola de la luz solar directa en un agitador horizontal a 700 ± 100 RPM.
10. Dispensar 50 µl de reactivo de parada en cada pocillo.
11. Leer la absorbancia de cada pocillo a 450 nm (filtro de referencia a 650 nm) dentro de 1 hora después de añadir el reactivo de parada.

XIII. CÁLCULOS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- Calcular la absorbancia promedio de las muestras en duplicado, eliminando los valores extremos.
- Calcular el porcentaje de unión para cada calibrador y muestra:

$$B/Bo \times 100 = DO(\text{calibrador o muestra}) \times 100$$

$$DO(\text{calibrador cero})$$
- Utilizando un papel de gráfico lineal-lineal o semi-log, trazar los valores (B/BO x 100) para cada punto de calibrador como una función de la concentración de estradiol para cada punto de calibrador.
- Interpolando los valores de las muestras (B/Bo x 100), determinar las concentraciones de las muestras de la curva de referencia.

Si utiliza un software para ajustar la curva, el algoritmo de 4 parámetros es el que proporciona el mejor ajuste de la curva.

XIV. EJEMPLO DE CURVA DE REFERENCIA TÍPICA

Los siguientes datos son solo como demostración y no pueden utilizarse en lugar de los datos generados en el ensayo.

Calibrador	Unidades de DO	B/Bo x 100
0 pg/ml	1,790	100
13 pg/ml	1,424	80
50 pg/ml	1,013	57
100 pg/ml	0,762	43
270 pg/ml	0,447	25
935 pg/ml	0,221	12

XV. VALORES ESPERADOS

Identificación	Número de sujetos	Rango (pg/ml)
Hombres	50	10 - 45
Post menopáusica	30	10 - 45
Mujeres		
Mujeres ovulando	14	
mujeres:		
(día 0 = pico HL)		13 - 80
Día: - 10		20 - 165
- 4		73 - 410
- 1		119 - 417
0		22 - 154
+2		44 - 174
+5		13 - 146
+10		
Mujeres embarazadas:	88	40 - 3100
1 st trimestre	39	1600 - 14000
2 nd trimestre	100	4200 - 32000
3 rd trimestre		

$$\text{pg/ml} \times 3,67 = \text{pmol/l}$$

$$\text{pmo/l} \times 0,272 = \text{pg/ml}$$

VI. CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

SENSIBILIDAD

La mínima concentración detectable (MDC) de estradiol en 10 ensayos diferentes fue 5 ± 2 pg/ml (promedio \pm DE). MDC se define como la concentración de estradiol correspondiente al 95% de la unión máxima.

ESPECIFICIDAD

El porcentaje de reacción cruzada se estimó, en condiciones fisiológicas en suero comparando con la concentración que produjo un 50% de inhibición de la unión:

Sustancias	Reactividad cruzada(%)
17-b estradiol	100
Estrona	2
Estriol	1.9
E2-3-Glucurónido	0,6
E2-17-Glucurónido	0,56
E2-17-Valerato	0,1
Cortisol	<0,001
Progesterona	0,03
Sulfato de Dhea	<0,0001
Testosterona	<0,001
Androstenediol	<0,001
Norgestrel	0,01
Premarin	0,06
Equilin	0,1

PRECISIÓN

Suero	Intra-ensayo			Entre ensayos			
	N	<X> \pm DE (pg/ml)	CV %	Suero	N	<X> \pm SD (pg/ml)	CV %
A	20	131 \pm 6	4,6	C	15	101 \pm 6	6,0
B	20	257 \pm 10	3,9	D	15	196 \pm 12	6,1

EXACTITUD

Muestra	Recuperación			Prueba de dilución			
	Añadido (pg/ml)	Recuperación (pg/ml)	Recuperación (%)	Diluciones de suero	Conc. teórica (pg/ml)	Conc. medida (pg/ml)	Recuperación (%)
Suero	916	719	78,4	1/1	997	997	100
	516	430	83,3	1/2	498	485	97
	316	304	96,2	1/4	249	252	101
	166	176	106,0	1/8	125	109	87

II. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, G.E. (1974) Ovarian and adrenal contribution to peripheral androgens during the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:340-346.
2. Baird, D.T., Fraser, I.S. (1974) Blood production and ovarian secretion rates of estradiol-17 beta and estrone in women throughout the menstrual cycle. J. Clin. Endocrinol. Metab. 38:1009-1017.
3. Haning, R.V. et al. (1985) Maternal serum progesterone, 17 Beta-estradiol and estriol are increased in pregnancies which follow treatment with human menopausal gonadotropins; effects of multiple gestation and maternal endocrine status. J. Steroid

Biochem. 22:833-829.

4. Mehta, R.R. (1987) Subcellular concentrations of estrone, estradiol, androstenedione and 17B-hydroxysteroid dehydrogenase (17BOH-SOH). Activity in malignant and non-malignant human breast tissues. Int. J. Cancer 40:305-308.
5. Selby, et al. (1986) Dose dependent response of symptoms, pituitary, and bone to transferma oestrogen in postmenopausal women. Br. Med. J. 293:1337-1339.

RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO		
	Calibradores (μ l)	Controles o muestras (μ l)
Calibradores	50	-
Controles-muestras	-	50
Estradiol-HRP	50	50
Anti-estradiol	50	50
Incubar durante 2 horas a TA agitando continuamente (700 RPM) Aspirar el contenido de cada pocillo Lavar 5 veces con 0,4 ml de solución de lavado y aspirar		
Solución de sustrato	200	200
Incubar 30 minutos a TA agitando continuamente (700 RPM)		
H ₂ SO ₄	50	50
Leer la microplaca a 450 nm (versus 650 nm)		

DIASource No de catálogo : KAP0621	Número P.I. : 1700483/es	No de revisión : 120803/1
------------------------------------	--------------------------	---------------------------