



Estrone Elisa

KAPDB420

LOT : 160129/2



Estrone Elisa

en

For the direct quantitative determination of Estrone by enzyme immunoassay in human serum.

KAPDB420

IN VITRO DIAGNOSTIC

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium - Tel: +32 10 84 99 11 - Fax : +32 10 84 99 90

INTENDED USE

For the direct quantitative determination of Estrone by enzyme immunoassay in human serum.

For *in vitro* diagnostic use only.

PRINCIPLE OF THE TEST

The principle of the following enzyme immunoassay test follows the typical competitive binding scenario. Competition occurs between an unlabeled antigen (present in calibrators, controls and patient samples) and an enzyme-labelled antigen (conjugate) for a limited number of antibody binding sites on the microwell plate. The washing and decanting procedures remove unbound materials. After the washing step, the enzyme substrate is added. The enzymatic reaction is terminated by addition of the stopping solution. The absorbance is measured on a microtiter plate reader. The intensity of the colour formed is inversely proportional to the concentration of estrone in the sample. A set of calibrators is used to plot a calibration curve from which the amount of estrone in patient samples and controls can be directly read.

CLINICAL APPLICATIONS

Estrone is a steroid like estriol and estradiol, belonging to the class of estrogens. The estrogens are involved in the development of female sex organs and secondary sex characteristics. Before the ovum is fertilized the main action of the estrogens is on the growth and function of the reproductive tract in order to prepare it for the fertilized ovum.

During the follicular phase of the menstrual cycle the estrone level shows a slight increase. The production of estrone then increases markedly to peak at around day 13. The peak is of short duration and by day 16 of the cycle levels will be low. A second peak occurs at around day 21 of the cycle and if fertilization does not occur, then the production of estrone decreases.

PROCEDURAL CAUTIONS AND WARNINGS

1. Users should have a thorough understanding of this protocol for the successful use of this kit. Reliable performance will only be attained by strict and careful adherence to the instructions provided.
2. Control materials or serum pools should be included in every run at a high and low level for assessing the reliability of results.
3. When the use of water is specified for dilution or reconstitution, use deionized or distilled water.
4. In order to reduce exposure to potentially harmful substances, gloves should be worn when handling kit reagents and human specimens.
5. All kit reagents and specimens should be brought to room temperature and mixed gently but thoroughly before use. Avoid repeated freezing and thawing of reagents and specimens.
6. A calibration curve must be established for every run.
7. The controls should be included in every run and fall within established confidence limits.
8. Improper procedural techniques, imprecise pipetting, incomplete washing as well as improper reagent storage may be indicated when assay values for the controls do not reflect established ranges.
9. When reading the microplate, the presence of bubbles in the microwells will affect the optical densities (ODs). Carefully remove any bubbles before performing the reading step.
10. The substrate solution (TMB) is sensitive to light and should remain colourless if properly stored. Instability or contamination may be indicated by the development of a blue colour, in which case it should not be used.
11. When dispensing the substrate and stopping solution, do not use pipettes in which these liquids will come into contact with any metal parts.
12. To prevent contamination of reagents, use a new disposable pipette tip for dispensing each reagent, sample, calibrator and control.
13. Do not mix various lot numbers of kit components within a test and do not use any component beyond the expiration date printed on the label.
14. Kit reagents must be regarded as hazardous waste and disposed of according to national regulations.

LIMITATIONS

1. All the reagents within the kit are calibrated for the direct determination of estrone in human serum. The kit is not calibrated for the determination of estrone in saliva, plasma or other specimens of human or animal origin.

2. Do not use grossly hemolyzed, grossly lipemic, icteric or improperly stored serum.
3. Any samples or control sera containing azide or thimerosal are not compatible with this kit, as they may lead to false results.
4. Only calibrator 0 may be used to dilute any high serum samples. The use of any other reagent may lead to false results.
5. The results obtained with this kit should never be used as the sole basis for a clinical diagnosis. For example, the occurrence of heterophilic antibodies in patients regularly exposed to animals or animal products has the potential of causing interferences in immunological tests. Consequently, the clinical diagnosis should include all aspects of a patient's background including the frequency of exposure to animals/products if false results are suspected.

SAFETY CAUTIONS AND WARNINGS POTENTIAL BIOHAZARDOUS MATERIAL

Human serum that may be used in the preparation of the calibrators and controls has been tested and found to be non-reactive for Hepatitis B surface antigen and has also been tested for the presence of antibodies to HCV and Human Immunodeficiency Virus (HIV) and found to be negative. However no test method can offer complete assurance that HIV, HCV and Hepatitis B virus or any infectious agents are absent. The reagents should be considered a potential biohazard and handled with the same precautions as applied to any blood specimen.

CHEMICAL HAZARDS

Avoid contact with reagents containing TMB, hydrogen peroxide and sulfuric acid. If contacted with any of these reagents, wash with plenty of water. TMB is a suspected carcinogen.

SPECIMEN COLLECTION AND STORAGE

Approximately 0.2 ml of serum is required per duplicate determination. Collect 4-5 ml of blood into an appropriately labelled tube and allow it to clot. Centrifuge and carefully remove the serum layer. Store at 4°C for up to 24 hours or at -10°C or lower if the analyses are to be done at a later date. Consider all human specimens as possible biohazardous materials and take appropriate precautions when handling.


SPECIMEN PRETREATMENT

This assay is a direct system; no specimen pretreatment is necessary.

REAGENTS AND EQUIPMENT NEEDED BUT NOT PROVIDED

1. Precision pipettes to dispense 50, 100, 150 and 300 µl
2. Disposable pipette tips
3. Distilled or deionized water
4. Plate shaker
5. Microwell plate reader with a filter set at 450nm and an upper OD limit of 3.0 or greater* (see assay procedure step 10).

REAGENTS PROVIDED

 **Rabbit Anti-Estrone Antibody Coated Microwell Plate-Break Apart Wells - Ready To Use.**
Contents: One 96 well (12x8) polyclonal antibody-coated microwell plate in a resealable pouch with desiccant.
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

Ag	HRP
----	-----

**Estrone-Horse Radish Peroxidase (HRP)
Conjugate - Ready to use**

Contents: Estrone-HRP conjugate in a protein-based buffer with a non-mercury preservative.
Volume: 14ml/bottle
Storage: Refrigerate at 2-8°C
Stability: 12 months or as indicated on label.

CAL	N
-----	---

Estrone Calibrators - Ready To Use. N = 0 to 5

Contents: Six vials containing estrone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking matrix with a defined quantity of estrone.

*Listed below are approximate concentrations, please refer to vial labels for exact concentrations.

Calibrator	Concentration	Volume/Vial
Calibrator 0	0 pg/ml	2.0 ml
Calibrator 1	10 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 2	25 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 3	100 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 4	400 pg/ml	0.5 ml
Calibrator 5	2000 pg/ml	0.5 ml

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vials or as indicated on label. Once opened, the calibrators should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

CONTROL	N
---------	---

Controls - Ready To Use.
N = 2

Contents: Two vials containing estrone in a protein-based buffer with a non-mercury preservative. Prepared by spiking buffer with defined quantities of estrone. Refer to vial labels for the acceptable range.

Volume: 0.5 ml/vial

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months in unopened vial or as indicated on label. Once opened, the controls should be used within 14 days or aliquoted and stored frozen. Avoid multiple freezing and thawing cycles.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Wash Buffer Concentrate – **X10**

Contents: One bottle containing buffer with a non-ionic detergent and a non-mercury preservative.

Volume: 50 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

Preparation: Dilute 1:10 in distilled or deionized water before use. If the whole plate is to be used dilute 50 ml of the wash buffer concentrate in 450 ml of water.

CHROM	TMB
-------	-----

TMB Substrate - Ready To Use.

Contents: One bottle containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide in a non-DMF or DMSO containing buffer.

Volume: 16 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

STOP	SOLN
------	------

Stopping Solution - Ready To Use.

Contents: One bottle containing 1M sulfuric acid.

Volume: 6 ml/bottle

Storage: Refrigerate at 2-8°C

Stability: 12 months or as indicated on label.

ASSAY PROCEDURE

Specimen Pretreatment:

None.

All reagents must reach room temperature before use. Calibrators, controls and specimen samples should be assayed in duplicate. Once the procedure has been started, all steps should be completed without interruption.

1. Prepare working solution of the wash buffer.
2. Remove the required number of microwell strips. Reseal the bag and return any unused strips to the refrigerator.
3. Pipette 50 µl of each calibrator, control and specimen sample into correspondingly labelled wells in duplicate.
4. Pipette 100 µl of the Estrone-HRP conjugate into each well (We recommend using a multichannel pipette).
5. Incubate on a plate shaker (approximately 200 rpm) for 1 hour at room temperature.

6. Wash the wells 3 times with 300 µl of diluted wash buffer per well and tap the plate firmly against absorbent paper to ensure that it is dry (The use of a washer is recommended).

7. Pipette 150 µl of TMB substrate into each well at timed intervals.

8. Incubate on a plate shaker for 10-15 minutes at room temperature (or until calibrator 0 attains dark blue colour for desired OD).

9. Pipette 50 µl of stopping solution into each well at the same timed intervals as in step 7.

10. Read the plate on a microwell plate reader at 450 nm within 20 minutes after addition of the stopping solution.

* If the OD exceeds the upper limit of detection or if a 450 nm filter is unavailable, a 405 or 415 nm filter may be substituted. The optical densities will be lower, however, this will not affect the results of patient/control samples.

CALCULATIONS

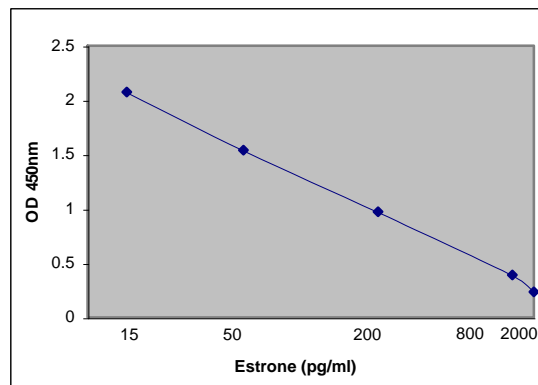
1. Calculate the mean optical density of each calibrator duplicate.
2. Draw a calibration curve on semi-log paper with the mean optical densities on the Y-axis and the calibrator concentrations on the X-axis. If immunoassay software is being used, a 4-parameter or 5-parameter curve is recommended.
3. Calculate the mean optical density of each unknown duplicate.
4. Read the values of the unknowns directly off the calibration curve.
5. If a sample reads more than 2000 pg/ml then dilute it with calibrator 0 at a dilution of no more than 1:8. The result obtained should be multiplied by the dilution factor.

TYPICAL TABULATED DATA

Calibrator	Mean OD	Value (pg/ml)
0	2.530	0
1	1.969	15
2	1.646	50
3	1.072	200
4	0.724	800
5	0.373	2000
Unknown	1.183	65

TYPICAL CALIBRATION CURVE

Sample curve only. **Do not** use to calculate results.



PERFORMANCE CHARACTERISTICS SENSITIVITY

The limit of detection (LoD) was determined from the analysis of 60 samples of the blank and a low value sample and it was calculated as follows: $LoD = \mu_B + 1.645\sigma_B + 1.645\sigma_S$, where σ_B and σ_S are the standard deviation of the blank and low value sample and μ_B is the mean value of the blank. The Limit of Detection (LoD) was determined to be 3 pg/ml.

SPECIFICITY (CROSS REACTIVITY)

The following compounds were tested for cross-reactivity with the Direct Estrone ELISA kit with estrone cross-reacting at 100%.

Steroid	%Cross Reactivity
Estrone	100
Estrone-3-Sulfate	4.9
17 β -Estradiol	2.2
Estrone-3-Glucuronide	1.2
17 β -Estradiol-3-Glucuronide	0.14

The following steroids were tested but cross-reacted at less than 0.1%: Androstenedione, Cholesterol, Corticosterone, Cortisol, Cortisone, DHEAS, Diethylstilbesterol, Estriol, 17 β -Estradiol-3-Glucuronide, Estradiol-Sulfate, Progesterone, 17-OH Progesterone and Testosterone.

INTRA-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed twenty times each on the same calibration curve. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	58.1	4.76	8.2
2	239.8	20.1	8.4
3	601.3	48.7	8.1

INTER-ASSAY PRECISION

Three samples were assayed in ten separate assays. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Mean	SD	CV%
1	24.46	2.18	8.9
2	78.69	7.85	10.0
3	505.13	38.32	7.6

RECOVERY

Spiked samples were prepared by adding defined amounts of estrone to three patient serum samples. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1 Unspiked	52	-	-
+200	315	252	125
+400	557	452	120
+1000	1235	1052	117
2 Unspiked	75	-	-
+375	493	450	110
+750	505.23	559.81	90.3
+1500	712.44	794.88	89.6
3 Unspiked	720.11	-	-
+200	758.13	837.64	90.5
+400	856.46	955.17	89.7
+1000	1013.61	1190.24	85.1

LINEARITY

Three patient serum samples were diluted with calibrator 0. The results (in pg/ml) are tabulated below:

Sample	Obs.Result	Exp.Result	Recovery%
1	340.67	-	-
1:2	165.35	170.34	97.1
1:4	95.39	85.17	112.0
1:8	48.47	42.58	113.8
2	1086.01	-	-
1:2	508.58	543.00	93.7
1:4	232.11	271.50	85.5
1:8	114.95	135.75	84.7
3	1313.21	-	-
1:2	612.98	656.61	93.4
1:4	318.63	328.30	97.1
1:8	134.98	164.15	82.2

COMPARATIVE STUDIES

The Estrone ELISA kit (y) was compared with LC/MS (x). The comparison of 19 serum samples yielded the following linear regression results:

$$y=0.9788x - 14.656$$
$$R^2=0.98$$

EXPECTED NORMAL VALUES

As for all clinical assays each laboratory should collect data and establish their own range of expected normal values.

Group	Range (pg/ml)
Males	13-149
Females Pre-menopausal	21-319
Females Post-menopausal	11-95

REFERENCES

- Hauptmann. H. et al: Concepts for the synthesis of biotinylated steroids. Part 2: 17 β -estradiol derivatives as immunochemical probes. Bioconjugate Chem. 11(2000) 537-548
- Dressendorfer R.A. et al: Synthesis of a cortisol-biotin conjugate and evaluation as atracer in an immunoassay for salivary cortisol measurement. J. Steroid Biochem. Molec. Biol.: 43 (1992) 683-692
- Mayer H.H.D. et al: Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 β . J. Steroid Biochem. 35 (1990) 263-269
- Folan J. et al: Solid-phase Enzymoimmunoassay of estrone in serum. Clin. Chem. 34(1988) 1843-1846
- Folan J. et al: Solid-Phase Enzymoimmunoassay of estrone in saliva. Clin. Chem. 35:4(1989)569-572
- Speroff L. et al: Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: Clinical gynecologic endocrinology & infertility, 3rd ed. Willanms & Wilkins. 1983: 1-41
- Kim M.H. et al: Plasma levels of estrogen, androgens and progesterone during normal and dexamethasone- treated cycles. J. Clin. Endocrinol. Metab.. 39(1974)706-712
- Speight A.C. et al; Non-protein bound oestrgens in plasma and urinary excretion of unconjugated oestrogens in non-pregnant women. J. Endocrino 83(1979) 385-391
- Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chemistry 45:7, 1999.
- Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Revision date : 2016-01-29



Para la determinación cuantitativa directa de la estrona mediante inmunoensayo enzimático en suero humano.

KAPDB420

DIAGNÓSTICO IN VITRO

DIAsource ImmunoAssays SA - Rue du Bosquet 2, B-1348 Louvain-la-Neuve, Bélgica - Tel.: +32 10 84 99 11 - Fax: +32 10 84 99 90

INDICACIONES

Para la determinación cuantitativa directa de la estrona mediante inmunoensayo enzimático en suero humano.

Solo para uso diagnóstico *in vitro*.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

El principio del siguiente inmunoensayo enzimático sigue la típica situación de unión competitiva. Se produce competición entre un antígeno no marcado (presente en los calibradores, controles y muestras del paciente) y un antígeno marcado con una enzima (conjugado) por un número limitado de lugares de unión de anticuerpos de la microplaca. Los procedimientos de lavado y decantación eliminan los materiales no unidos. El sustrato enzimático se añade después del paso de lavado. La reacción enzimática se detiene añadiendo solución de parada. Se mide la absorbancia con un lector de placas de microvaloración. La intensidad del color formado es inversamente proporcional a la concentración de estrona de la muestra. Se utiliza un conjunto de calibradores para trazar una curva de calibración en la que poder leer directamente la cantidad de estrona en las muestras del paciente y en los controles.

APLICACIONES CLÍNICAS

La estrona es un esteroide como el estriol y el estradiol, y pertenece a la clase de los estrógenos. Los estrógenos están implicados en el desarrollo de los órganos sexuales femeninos y de las características sexuales secundarias. Antes de que se fertilice el óvulo, la acción principal de los estrógenos se centra en el crecimiento y funcionamiento del tracto reproductivo a fin de prepararlo para el óvulo fertilizado.

Durante la fase folicular del ciclo menstrual, el nivel de estrona presenta un ligero aumento. La producción de estrona aumenta entonces considerablemente hasta alcanzar un pico después de alrededor de 13 días. El pico es de corta duración y para el día 16 del ciclo los niveles volverán a estar bajos. Se produce un segundo pico alrededor de los 21 días del ciclo y si no se produce fertilización, entonces disminuye la producción de estrona.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS SOBRE EL PROCEDIMIENTO

1. Los usuarios deben entender perfectamente bien el presente protocolo para que la utilización de este kit sea satisfactoria. Se obtendrá una eficacia diagnóstica fiable únicamente observando estricta y cuidadosamente las instrucciones proporcionadas.
2. Los materiales de control o las mezclas de sueros deberían incluirse en cada análisis a un nivel alto y bajo para evaluar la fiabilidad de los resultados.
3. Cuando se especifique utilizar agua para la dilución o reconstitución, use agua desionizada o destilada.
4. Para reducir la exposición a sustancias potencialmente nocivas, se deberán llevar guantes al manipular los reactivos del kit y las muestras humanas.
5. Todos los reactivos del kit y las muestras deberán estar a temperatura ambiente y mezclarse suavemente pero completamente antes de utilizar. Evite congelar y descongelar los reactivos y las muestras repetidamente.
6. Debe establecerse una curva de calibración para cada análisis.
7. Los controles deben incluirse en cada análisis y encontrarse dentro de los límites de confianza establecidos.
8. Cuando los valores de los controles no se encuentren dentro de los márgenes establecidos pueden indicar unas técnicas inadecuadas del procedimiento, un pipeteo impreciso, un lavado incompleto, así como una conservación inadecuada del reactivo.
9. Al leer la microplaca, la presencia de burbujas en los micropocillos afectará a las densidades ópticas (DO). Elimine con cuidado las burbujas antes de realizar el paso de lectura.
10. La solución de sustrato (TMB) es fotosensible, debiendo permanecer incolora si se conserva correctamente. La aparición de un color azul podría indicar inestabilidad o contaminación, en cuyo caso no debería utilizarse.
11. Al dispensar el sustrato y la solución de parada, no deben emplearse pipetas en las que estos líquidos entren en contacto con partes metálicas.
12. Con objeto de prevenir la contaminación de los reactivos, utilice una punta de pipeta desechable nueva para la dispensación de cada reactivo, muestra, calibrador y control.
13. No mezcle varios números de lote de componentes del kit en una misma prueba y no utilice ningún componente si se ha pasado la fecha de caducidad impresa en la etiqueta.

14. Los reactivos del kit deben considerarse residuos peligrosos y desecharse de conformidad con la normativa nacional.

LIMITACIONES

1. Todos los reactivos del kit están calibrados para la determinación directa de estrona en suero humano. El kit no está calibrado para determinar la estrona en saliva, plasma ni en otras muestras de origen humano o animal.
2. No utilice suero muy hemolizado, muy lipémico, icterico o almacenado inadecuadamente.
3. Las muestras o sueros de control que contengan azida o tiomersal no son compatibles con este kit, ya que pueden producir resultados falsos.
4. Solo puede utilizarse el calibrador 0 para diluir las muestras séricas altas. El uso de cualquier otro reactivo puede producir resultados falsos.
5. Los resultados obtenidos con este kit no deben utilizarse nunca como la única base para realizar un diagnóstico clínico. Por ejemplo, la aparición de anticuerpos heterofílicos en pacientes expuestos regularmente a animales o a productos para animales puede causar interferencias en las pruebas inmunológicas. Por consiguiente, el diagnóstico clínico debería incluir todos los aspectos de la historia de un paciente, incluyendo la frecuencia de la exposición a animales o sus productos si se sospecha de resultados falsos.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS DE SEGURIDAD MATERIAL DE POTENCIAL RIESGO BIOLÓGICO

Se ha analizado el suero humano que puede utilizarse en la preparación de los calibradores y controles, y ha resultado no ser reactivo para el antígeno de superficie de la hepatitis B; también se ha analizado para detectar la presencia de anticuerpos frente al VHC y al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) y se ha determinado que es negativo. Sin embargo, ningún método de análisis puede ofrecer una garantía total de la ausencia de VIH, VHC y de virus de la hepatitis B ni de un microorganismo infeccioso. Los reactivos deben considerarse potencialmente biopeligrosos y deben manipularse con las mismas precauciones que se aplicarían a cualquier muestra sanguínea.

RIESGOS QUÍMICOS

Evite el contacto con reactivos que contengan TMB, peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico. Si se produce el contacto con alguno de estos reactivos, lávese con abundante agua. La TMB es potencialmente carcinógena.

RECOGIDA Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se requieren aproximadamente 0,2 ml de suero por cada determinación por duplicado. Recoja 4-5 ml de sangre en un tubo adecuadamente etiquetado y deje que coagule. Centrifugue y retire con cuidado la capa de suero. Conserve a 4 °C durante un máximo de 24 horas o a -10 °C o inferior si los análisis se van a realizar en una fecha posterior. Considere todas las muestras humanas como materiales de posible riesgo biológico y tome las precauciones adecuadas cuando las manipule.

PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Este ensayo es un sistema directo y no requiere ningún pretratamiento de las muestras.

REACTIVOS Y EQUIPO NECESARIO NO PROPORCIONADO

1. Pipetas de precisión para dispensar 50, 100, 150 y 300 µl
2. Puntas de pipeta desechables
3. Agua destilada o desionizada
4. Agitador de microplacas
5. Lector de microplacas con un filtro ajustado a 450 nm y un límite de DO superior de 3,0 o mayor* (véase el paso 10 del procedimiento del ensayo).

REACTIVOS PROPORCIONADOS



Microplaca de pocillos separables recubiertos con anticuerpos antiestrona de conejo - Lista para usar.

Contenido: una microplaca de 96 pocillos (12 x 8) recubierta con anticuerpos policlonales en una bolsa resellable con desecante.

Conservación: refrigerar a 28 °C

Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

Ag	HRP
----	-----

Conjugado de estrona-peroxidasa de rábano picante (HRP) – Listo para usar.

Contenido: conjugado de estrona-HRP en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio.
 Volumen: 14ml/frasco
 Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

CAL	N
-----	---

Calibradores de estrona - Listos para usar. N = 0 a 5

Contenido: seis viales que contienen estrona en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo matriz con una cantidad definida de estrona.
 * A continuación se indican concentraciones aproximadas, consulte en las etiquetas de los viales las concentraciones exactas.

Calibrador	Concentración	Volumen / vial
Calibrador 0	0 pg/ml	2,0 ml
Calibrador 1	10 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 2	25 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 3	100 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 4	400 pg/ml	0,5 ml
Calibrador 5	2000 pg/ml	0,5 ml

Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abiertos, los calibradores deben utilizarse antes de 14 días o tomar alícuotas y conservar congelados. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

CONTROL	N
---------	---

Controles - Listos para usar. N = 2

Contenido: dos viales que contienen estrona en un tampón de base proteica con un conservante sin mercurio. Preparados añadiendo tampón con cantidades definidas de estrona. Consulte en las etiquetas el intervalo aceptable.
 Volumen: 0,5 ml/vial
 Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses sin abrir o según indique la etiqueta. Una vez abiertos, los controles deben utilizarse antes de 14 días o conservarse congelados en partes alícuotas. Evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

WASH	SOLN	CONC
------	------	------

Tampón de lavado concentrado – X10

Contenido: un frasco que contiene tampón con un detergente no iónico y un conservante sin mercurio.
 Volumen: 50 ml/frasco
 Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.
 Preparación: diluir 1:10 en agua destilada o desionizada antes de usar. Si se va a utilizar la placa completa, diluir 50 ml del tampón de lavado concentrado en 450 ml de agua.

CHROM	TMB
-------	-----

Sustrato de TMB - Listo para usar.

Contenido: un frasco que contiene tetrametilbencidina y peróxido de hidrógeno en un tampón que no contenga DMF ni DMSO.
 Volumen: 16 ml/frasco
 Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

STOP	SOLN
------	------

Solución de parada - Lista para usar.

Contenido: un frasco con ácido sulfúrico 1 M.
 Volumen: 6 ml/frasco
 Conservación: refrigerar a 28 °C
 Estabilidad: 12 meses o según indique la etiqueta.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO
Pretratamiento de las muestras:
Ninguno.

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizar. Los calibradores, los controles y las muestras humanas deben analizarse por duplicado. Una vez que se haya iniciado al procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.

1. Prepare la solución de trabajo del tampón de lavado.

2. Retire el número necesario de tiras de micropocillos. Vuelva a sellar la bolsa y a guardar las tiras no utilizadas en el frigorífico.
 3. Pipetee 50 µl de cada calibrador, control y muestra en los pocillos marcados respectivamente por duplicado.
 4. Pipetee 100 µl del conjugado de estrona-HRP en cada pocillo (recomendamos usar una pipeta multicanal).
 5. Incube en un agitador de microplacas (aproximadamente a 200 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente.
 6. Lave los pocillos 3 veces con 300 µl de tampón de lavado diluido por pocillo y dé unos golpecitos con la placa firmemente contra papel absorbente para asegurarse de que esté seca (se recomienda usar un lavador).
 7. Pipetee 150 µl de sustrato de TMB en cada pocillo a intervalos regulares.
 8. Incube en un agitador de microplacas durante 10-15 minutos a temperatura ambiente (o hasta que el calibrador 0 alcance el color azul oscuro de la DO deseada).
 9. Pipetee 50 µl de solución de parada en cada pocillo a los mismos intervalos regulares que en el paso 7.
 10. Lea la placa en un lector de microplacas a 450 nm antes de transcurridos 20 minutos después de la adición de la solución de parada.
- * Si la DO sobrepasa el límite superior de detección o si no se dispone de un filtro de 450 nm, puede sustituirse por un filtro de 405 o 415 nm. Las densidades ópticas serán inferiores, sin embargo, esto no afectará a los resultados de las muestras del paciente/control.

CÁLCULOS

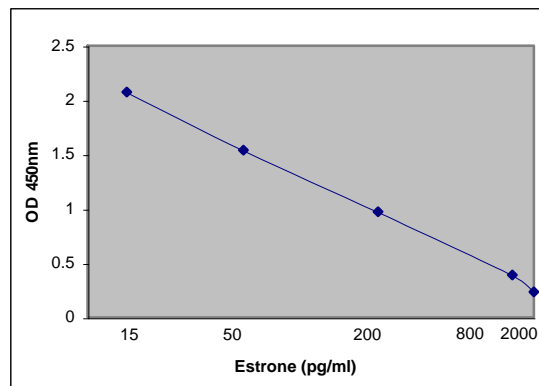
1. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado del calibrador.
2. Trace una curva de calibración en papel semilogarítmico con las densidades ópticas medias en el eje de ordenadas (Y) y las concentraciones del calibrador en el eje de abscisas (X). Si se va a utilizar un software para inmunoensayos, se recomienda una curva de 4 o de 5 parámetros.
3. Calcule la densidad óptica media de cada duplicado desconocido.
4. Lea los valores de los desconocidos directamente de la curva de calibración.
5. Si la lectura de alguna muestra es superior a 2000 pg/ml, entonces dilúyala con el calibrador 0 a una dilución que no sea mayor de 1:8. El resultado obtenido deberá multiplicarse por el factor de dilución.

DATOS TÍPICOS TABULADOS

Calibrador	DO media	Valor (pg/ml)
0	2.530	0
1	1.969	15
2	1.646	50
3	1.072	200
4	0.724	800
5	0.373	2000
Desconocido	1.183	65

CURVA TÍPICA DE CALIBRACIÓN

Solo curva de la muestra. **No** usar para calcular resultados.



EFICACIA DIAGNÓSTICA SENSIBILIDAD

El límite de detección (LoD) se determinó a partir del análisis de 60 muestras de blanco y una muestra de valor bajo, y se calculó como sigue:
 $LoD = \mu B + 1,645 \sigma B + 1,645 \sigma S$, donde σB y σS son la desviación estándar del blanco y la muestra de valor bajo, y μB es el valor medio del blanco.
 Se determinó que el límite de detección (LoD) era de 3 pg/ml.

ESPECIFICIDAD (REACTIVIDAD CRUZADA)

Se evaluó la reactividad cruzada de los siguientes compuestos con el kit Direct Estrone ELISA, siendo la reactividad cruzada de la estrona del 100%.

Esteroides	% Reactividad cruzada
Estrona	100
Estrona-3-sulfato	4.9
17 β -estradiol	2.2
Estrona-3-glucuronida	1.2
17 β -estradiol-3-glucuronida	0.14

Se evaluaron los siguientes esteroides pero arrojaron una reactividad cruzada inferior al 0,1%: androstenediona, colesterol, corticosterona, cortisol, cortisona, DHEAS, dietilestilbesterol, estriol, 17 β -estradiol-3-glucuronida, sulfato de estradiol, progesterona, 17-OH progesterona y testosterona.

PRECISIÓN INTRAENSAYO

Se analizaron tres muestras veinte veces cada una con la misma curva de calibración. Los resultados (en pg/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	DE	%CV
1	58.1	4.76	8.2
2	239.8	20.1	8.4
3	601.3	48.7	8.1

PRECISIÓN INTERENSAYO

Se analizaron tres muestras en diez ensayos diferentes. Los resultados (en pg/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Media	DE	%CV
1	24.46	2.18	8.9
2	78.69	7.85	10.0
3	505.13	38.32	7.6

RECUPERACIÓN

Se prepararon muestras adicionadas añadiendo cantidades definidas de estrona a tres muestras de suero del paciente. Los resultados (en pg/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado obs.	Resultado esp.	% Recuperación
1 sin adicionar	52	-	-
	315	252	125
	557	452	120
	1235	1052	117
2 sin adicionar	75	-	-
	493	450	110
	505.23	559.81	90.3
	712.44	794.88	89.6
3 sin adicionar	720.11	-	-
	758.13	837.64	90.5
	856.46	955.17	89.7
	1013.61	1190.24	85.1

LINEALIDAD

Se diluyeron tres muestras de suero del paciente con calibrador 0. Los resultados (en pg/ml) se tabulan a continuación:

Muestra	Resultado obs.	Resultado esp.	% Recuperación
1	340.67	-	-
1:2	165.35	170.34	97.1
1:4	95.39	85.17	112.0
1:8	48.47	42.58	113.8
2	1086.01	-	-

1:2	508.58	543.00	93.7
1:4	232.11	271.50	85.5
1:8	114.95	135.75	84.7
3	1313.21	-	-
1:2	612.98	656.61	93.4
1:4	318.63	328.30	97.1
1:8	134.98	164.15	82.2

ESTUDIOS COMPARATIVOS

El kit Estrone ELISA (y) se comparó con cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) (x). La comparación de 19 muestras de suero arrojó los siguientes resultados de regresión lineal:
 $y = 0,9788 x - 14,656$
 $R^2 = 0,98$

VALORES NORMALES ESPERADOS

Como en todos los análisis clínicos, cada laboratorio debería recoger datos y establecer su propio intervalo de valores normales esperados.

Grupo	Intervalo (pg/ml)
Hombres	13-149
Mujeres premenopáusicas	21-319
Mujeres posmenopáusicas	11-95

BIBLIOGRAFÍA

- Hauptmann. H. et al: Concepts for the synthesis of biotinylated steroids. Part 2: 17 β -estradiol derivatives as immunochemical probes. Bioconjugate Chem. 11 2000 537 99 -548
- Dressendorfer R.A. et al: Synthesis of a cortisol-biotin conjugate and evaluation as atracer in an immunoassay for salivary cortisol measurement. J. Steroid Biochem. Molec. Biol.: 43 (1992) 683-692
- Mayer H.H.D. et al: Immunoaffinity chromatography and a biotin-streptavidin amplified immunoassay for sensitive and specific estimation of estradiol-17 β . J. Steroid Biochem. 35 (1990) 263-269
- Folan J. et al: Solid-phase Enzymoimmunoassay of estrone in serum. Clin. Chem. 34(1988) 1843-1846
- Folan J. et al: Solid-Phase Enzymoimmunoassay of estrone in saliva. Clin. Chem. 35:4(1989)569-572
- Speroff L. et al: Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: Clinical gynecologic endocrinology & infertility, 3rd ed. Willanms & Wilkins. 1983: 1-41
- Kim M.H. et al: Plasma levels of estrogen, androgens and progesterone during normal and dexamethasone-treated cycles. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39(1974) 706-712
- Speight A.C. et al; Non-protein bound oestrgens in plasma and urinary excretion of unconjugated oestrogens in non-pregnant women. J. Endocrino 83(1979) 385-391
- Kricka, L.J., Human anti-animal antibody interferences in immunological assays. Clin. Chemistry 45:7, 1999.
- Check, J.H., et al, Falsely elevated steroidal assay levels related to heterophile antibodies against various animal species. Gynecol Obstet Invest 40:139-140, 1995.

Fecha de revisión: 29-01-2016