

# ESTRIOL

## Análisis ELISA para la determinación cuantitativa de estriol libre en suero o plasma humano

### Presentación

<b>REF</b>	55040	96 Determinaciones	Estuche completo
<b>IVD</b>			

### Uso previsto

Estriol (1,3,5(10)-estratrien-3, 16 $\alpha$ , 17 $\beta$ -triol; E3) representa hasta el 90% de los Estrógenos C<sub>18</sub> en Plasma y Orina. Es el estrógeno más importante producido durante el embarazo<sup>1</sup> cuyas concentraciones de plasma y orina se elevan en forma continua con el embarazo hasta en mil veces en el 3er. trimestre.

A través de la placenta, el estriol libre no ligado llega al sistema circulatorio donde es transformado rápidamente en derivados los cuales aceleran su eliminación<sup>2</sup>. El tiempo medio en la sangre materna es de solo 20 minutos<sup>3</sup>. Por lo tanto el estriol libre es un indicador muy específico para la capacidad de función de la unidad fetoplacentaria. Se utiliza por esto a menudo en el marco del control diagnóstico de embarazos riesgosos.

El estado del feto puede juzgarse mejor mediante la determinación de la concentración de estriol del plasma y preferirse a orina en razón de su especificidad más elevada para la unidad fetoplacentaria. La concentración de estriol de la orina puede ser influenciada por las funciones o disfunciones del hígado o riñones de la madre<sup>4</sup> así como por la ingestión de numerosos antibióticos.

El estriol libre ofrece, comparado al estriol total, una aclaración mucho más precisa y rápida sobre la situación del feto en embarazos de diabéticas, ya que no se presenta la hidrólisis del estriol ligado.

### Principio - EIA Competitivo -

El análisis ESTRIOL ELISA se basa en la interacción competitiva de estriol de la muestra y un conjugado enzimático-hormonal por una limitada cantidad de anticuerpos (conejo) anti-estriol inmovilizados. Por eso la cantidad de conjugado hormonal-enzimático ligada es inversamente proporcional a la concentración de estriol en la muestra.

Después de la incubación de la muestra y del conjugado hormonal-enzimático es eliminado por lavado el conjugado no ligado. Con la adición de la solución sustrato (paso 2) se desarrolla un color azul, que se transforma a amarillo después de parar la reacción. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de estriol de la muestra.

La absorbancia de los calibradores y las muestras se determina utilizando un lector fotométrico de micropocillos ELISA (por ejemplo HUMAREADER). Los valores de concentración de muestras desconocidas se determinan mediante una curva de calibración obtenida con ayuda de calibradores de concentraciones conocidas de estriol.

### Reactivos y contenido

<b>MIC</b>	12	<b>Tiras de Micropocillos (en portatiras)</b> Tiras ( <b>divisibles</b> ) de 8 pocillos con anticuerpos (conejo) anti-estriol	
<b>CAL</b>	A - F	<b>Calibradores</b> (tapa blanca), 6x1,0ml listos para usar, en suero humano, <b>coloreado rojo</b> Concentración de estriol: 0 ( <b>A</b> ), 0,3 ( <b>B</b> ), 1,2 ( <b>C</b> ), 4,0 ( <b>D</b> ), 15 ( <b>E</b> ), y 40 ( <b>F</b> ) ng/ml	
<b>CON</b>	14 ml	<b>Conjugado enzimático-antígeno</b> (tapa blanca) listo para usar Conjugado Estriol – HRP	pH 6,9 ± 0,2
		BSA	0,5 %
		TRIS/MOPS buffer	0,05 mol/l
		NaCl	0,1 mol/l
<b>WS</b>	30 ml	<b>Solución de lavado</b> (tapa negra) Concentrado para aprox. 1200 ml TWEEN 20	pH 7,3 ± 0,1 0,2 %
		TRIS-NaCl-buffer	3,0 mmol/l
<b>SUB</b>	14 ml	<b>Solución sustrato</b> (tapa amarilla) listo para usar 3,3', 5,5'- Tetrametilbenzidina (TMB)	pH 3,5 – 4,0 0,26 g/l
		Peróxido de hidrógeno	0,015 %
		Buffer acetato de sodio	0,05 mol/l
		DMSO	< 5 %
<b>STOP</b>	14 ml	<b>Solución de detención</b> (tapa roja) Acido sulfúrico	0,5 mol/l

**Agentes preservantes:** Concentración total < 0,7%

### Notas de seguridad

No ingerir los reactivos. Evitar el contacto con los ojos, piel y membranas mucosas. Todas las muestras de pacientes y **CAL** deberían ser manipulados como posibles agentes potencialmente infecciosos. **CAL** han sido encontrados negativos para HBsAg y anticuerpos contra VHC y VIH 1 + 2 en los donantes. Usar ropa protectora y guantes desechables según las buenas prácticas de laboratorio (GLP).

Todos los materiales contaminados con muestras o **CAL** deben inactivarse por métodos aprobados (autoclavado o tratamiento químico) según las regulaciones aplicables.

**STOP** irrita los ojos, la piel y membranas mucosas. En caso de contacto, lavar intensamente con abundante agua y consultar un médico.

### Estabilidad

Los reactivos son estables hasta las fechas de expiración señaladas en las etiquetas individuales cuando se almacenan a 2...8°C.

Después de abierto los reactivos deben almacenarse a 2...8°C y utilizarse dentro de 60 días (ver también „Nota“).

### MIC

- están selladas en un envase de aluminio con un desecante.
- Antes de abrir, las tiras deben estar a **temperatura ambiente**.
- Las tiras no utilizadas deberán ser devueltas al envase con cierre y almacenadas con el desecante. Las tiras almacenadas de esta manera a 2...8°C pueden ser usadas dentro de 60 días (ver "Nota").
- No tocar el anillo superior o el fondo de los micropocillos con los dedos.

### Preparación de reactivos

Todos los reactivos deben estar a **temperatura ambiente** (15...25°C) antes del uso. Los reactivos que no están en uso almacenar nuevamente en forma inmediata a 2...8°C.

### Solución de trabajo de lavado **WASH**

- Diluir **WS** a 1200 ml con agua fresca, desionizada en recipiente apropiado. Enjuagar botellita varias veces.
- Estabilidad: **Hasta 2 semanas a 15...25°C**.

### Muestra

Suero o Plasma EDTA

No usar muestras hiperlipémicas o hemolíticas así como muestras que contienen azida de sodio.

Muestras pueden ser almacenadas 3 días a 2...8°C o hasta 30 días a -20°C. **Congelar y descongelar solamente una vez**. Muestras descongeladas deben ser homogeneizadas. Eliminar el material particulado por centrifugación o filtración.

### Procedimiento

**Seguir el procedimiento exactamente como se describe.**

### Notas de uso

**U1:** No mezclar o usar componentes de diferentes números de lote. No mezclar tapas de envases (riesgo de contaminación). No usar reactivos después de sus fechas de expiración.

**U2:** No usar reactivos que pueden ser contaminados o que tienen aspecto diferente o olen diferentemente que normal.

**U3:** Notar el reparto **CAL**, las muestras y los controles cuidadosamente en la hoja provista en el estuche.

**U4:** **MIC** – sacar el número requerido y colocarlos firmemente en el portatiras.

**U5:** **Analizar** cada **CAL**, control o muestra **por duplicado**. **Pipetearlos en el fondo** de los micropocillos.

**U6:** **Siempre deben agregarse los reactivos en el mismo orden y tiempo para minimizar diferencias en los tiempos de reacción entre los micropocillos**. Es importante para obtener resultados reproducibles. El pipeteo de las muestras no debería exceder de 10 minutos. De lo contrario pipetear la curva **CAL** en las posiciones indicadas en la mitad del intervalo de la serie. Si se emplea más de una placa, repetir la curva de calibración para cada placa.

**U7:** Evitar/remover burbujas de aire antes de las incubaciones y lecturas de absorbancia.

**U8:** **SUB** inicia y **STOP** termina una reacción cinética. **Evitar la luz intensa** durante el desarrollo del color.

**U9:** **MIC** - **Después de cada pipeteo agitar suavemente durante 20-30 sec.** sin verter las soluciones para asegurar una buena mezcla. Si está disponible, mezclar en un mezclador de pocillos (p.ej. HUMAREADER).

## Procedimiento de lavado

El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente producirá una mala precisión o absorbancias falsamente elevadas.

L1: Aspirar el contenido, agregar [WASH], aspirar después de aproximadamente 30 sec. de enjuague y repetir el lavado.

L2: En el caso de lavadores automáticos, se deben cebar con [WASH] y lavar los pocillos 3 veces. Asegurarse que el lavador llene los pocillos completamente y los aspire eficientemente después de 30 sec. (líquido remanente: < 15 µl).

L3: Después del lavado, **remover el líquido remanente** invirtiendo los micropocillos sobre papel absorbente.

## Esquema de pipeteo

Los reactivos y las muestras deberían estar a temperatura ambiente antes del uso.		
Paso 1	Pocillo [µl]	
	A1...D2	E2...
[CAL] A-F; en duplicado	20	--
Muestras, Controles; en duplicado	--	20
[CON]	100	100
Mezclar		
Incubar por 60 min. a 20...25°C		
Lavar 3 veces, como descrito (ver L1/L2 + L3)		
[WASH]	400	400
Paso 2		
[SUB]	100	100
Incubar por 15 min. a 20...25°C (ver U8)		
[STOP]	100	100
Mezclar cuidadosamente		
Realizar medición de la Absorción a <b>450 nm</b> lo más rápido posible respectivamente <b>en el transcurso de 30 minutos</b> después de haber parado la reacción utilizando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm (si disponible).		

## Validación del análisis

Los resultados pueden ser considerados válidos, si se cumplen los siguientes criterios:

Absorbancia Máxima ([CAL] A)  $\geq 1,0$

El control debe analizarse a 3 concentraciones:

Concentración de estriol a 80% A max = 0,2 – 0,73 ng/ml

Concentración de estriol a 50% A max = 1,54 – 4,0 ng/ml

Concentración de estriol a 20% A max = 17,0 – 38,0 ng/ml

## Cálculo

Para la interpolación de la concentración de estriol de muestras desconocidas se necesita una curva de calibración (ejemplo ver figura).

- [CAL] - Graficar sobre papel milimetrado lineal las absorbancias individuales de los duplicados contra la concentración de estriol respectiva en ng/ml (no promediar las determinaciones de los duplicados).
- Trazar la mejor curva a través de los puntos del gráfico.
- Proyectar del eje Y sobre la curva el valor medio de absorbancia (de determinación en duplicado) de la muestra desconocida (S). Leer sobre el eje X la concentración (ng/ml) correspondiente.

## Interpretación de resultados

No debe desanidarse la fuerte variabilidad de la concentración de estriol en la interpretación de los valores de estriol. Los valores no solo pueden variar día a día, sino también hora a hora. Valores diurnos son más altos que valores nocturnos. El máximo se alcanza por el mediodía y el valor más bajo por medianoche.

Los valores de plasma estriol se incrementan durante el embarazo en forma continua<sup>5</sup>. La variabilidad biológica de la unidad fetoplacentaria es especialmente alta en los últimos meses del embarazo, lo que lleva a una correspondiente elevada faja de fluctuación de los valores de medición. Los valores normales están listados en la tabla de abajo.

Una reducción repentina no fisiológica de la producción fetoplacentaria de estriol lleva a una rápida disminución de los valores de estriol libre en el suero maternal<sup>6</sup>. El causal puede ser una insuficiencia placentaria con el riesgo de un aborto.

La determinación sola de estriol libre es insuficiente para un diagnóstico. La anamnesis así como exámenes clínicos adicionales, especialmente parámetros diagnósticos (hormonales), deberían tenerse en cuenta.

## Valores normales

Semana de embarazo p.m.	Valores de estriol [ng/ml]	Semana de embarazo p.m.	Valores de estriol [ng/ml]	Embarazo de mellizos [ng/ml]
12	0.3 – 1.0	22 - 23	2.7 – 16	3 – 18
13	0.3 – 1.1	24 - 25	2.9 – 17	3 – 20
14	0.4 – 1.6	26 - 27	3.0 – 18	4 – 21
15	1.0 – 4.4	28 - 29	3.2 – 20	4 – 22
16	1.4 – 6.5	30 - 31	3.6 – 22	5 – 25
17	1.5 – 6.6	32 - 33	4.6 – 23	6 – 39
18	1.6 – 8.5	34 - 35	5.1 – 25	7 – 39
19	1.9 – 11	36 - 37	7.2 – 29	9 – 38
20	2.1 - 13	38 - 39	7.8 – 37	13 – 40
21	2.6 - 14	40 - 42	8.0 - 39	---

Factor de cálculo: 1 ng/ml = 3,47 nmol/l

Cada laboratorio debería determinar sus propios rangos de referencia utilizando los instrumentos/equipos, métodos de colección de sangre y técnicas de análisis usuales empleados normalmente en dicho laboratorio.

## Características de la ejecución

La sensibilidad analítica del Test ESTRIOL ELISA se encuentra en < 0,02 ng/ml de material de muestra.

Muestras con una concentración de estriol mayor a 40 ng/ml deberían ser diluidas con el [CAL] A (0 ng/ml) 1+9 y multiplicarse el resultado por 10.

Los datos típicos de ejecución de la prueba pueden ser encontrados en el informe de verificación, accesible vía

[www.human.de/data/gb/vr/el-estri.pdf](http://www.human.de/data/gb/vr/el-estri.pdf) ó

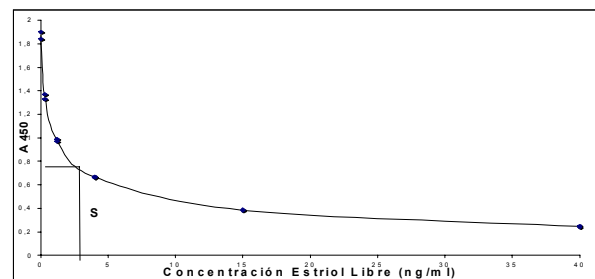
[www.human-de.com/data/gb/vr/el-estri.pdf](http://www.human-de.com/data/gb/vr/el-estri.pdf)

## Nota

Los componentes del estuche son estables hasta la expiración aún después de abiertos. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación está directamente relacionada con el número de tomas del reactivo. Por lo tanto, el límite de 60 días en viales abiertos se fijó por razones de seguridad.

La manipulación debería siempre estar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio (GLP\*). ¡Los criterios de validación del análisis deben cumplirse siempre!

(\*Esto incluye: Colocar la tapa debida en el vial y cerrarlo firmemente / Sacar de los viales de stock solamente los reactivos necesarios para la corrida si entraran en contacto con otras soluciones contaminantes como lo son las muestras, etc. / Las soluciones de stock siempre deben regresarse a 2...8°C si no se usan.)



## Literatura

- Diczfalusy, E. and Mancuso, S., In: Foetus and Placenta (Klopper, A. and Diczfalusy, E. eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 191-248 (1969)
- Klopper, A. et al., Amer. J. Obstet. and Gynecol. **117**, 21-26 (1973)
- Katagiri, H. et al., Amer. J. Obstet. and Gynecol. **124**, 272-280 (1976)
- Young, et al., Amer. J. Obstet. and Gynecol. **126**, 38-42 (1976)
- Goebelsmann, U. et al., Acta Endocrin **74**, 592-604 (1973)
- Goebelsmann, U. and Jaffe, R.B., Acta Endocrin. **66**, 679 (1991)

EL-ESTRI  
INF 5504001 E  
06-2004-5



**Human**