

# INSTRUÇÕES DE USO

## ESTRADIOL ELISA

Teste de ELISA para a Determinação Quantitativa de 17 $\beta$ -Estradiol no Soro ou Plasma Humano  
Reagentes suficientes para 96 determinações

### 1. SUMÁRIO

O Estradiol é um hormônio esteróide com o peso molecular de 272,4 Daltons. É considerado o hormônio estrógeno mais importante e ativo nas mulheres em idade reprodutiva, sendo produzido pelos ovários e pela placenta. Nos homens, o hormônio é produzido pelos testículos.

Em mulheres não-grávidas e com ciclos menstruais regulares, a secreção de Estradiol é realizada em um padrão cíclico e bifásico, elevando-se imediatamente antes da ovulação e declinando-se após o seu término. Em mulheres grávidas, os níveis de Estradiol séricos aumentam e mantêm-se elevados durante toda a gravidez.

Níveis elevados do hormônio também são encontrados em pacientes com tumores ovarianos e adrenais, puberdade feminina precoce, doenças hepáticas e ginecomastia masculina. Nas mulheres, níveis baixos são encontrados em casos de hipogonadismo primário e secundário.

A determinação de Estradiol é útil na avaliação de disfunções menstruais tais como a puberdade precoce, menopausa e amenorréias primária e secundária. A dosagem do hormônio também é utilizada para monitorar a indução da ovulação em tratamentos de fertilização.

### 2. PRINCÍPIO

Neste método, os padrões da curva e as amostras de soro ou plasma em análise são adicionados aos respectivos poços da microplaca que foram previamente recobertos por anticorpos anti-17 $\beta$ -Estradiol. O 17 $\beta$ -Estradiol presente na amostra biológica e nos padrões da curva, compete com o 17 $\beta$ -Estradiol conjugado à enzima peroxidase, pelas ligações aos anticorpos imobilizados na microplaca. Após a etapa de incubação, o excesso de 17 $\beta$ -Estradiol não-imobilizado é eliminado na etapa de lavagem e o substrato enzimático é então adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul. Esta, por sua vez, torna-se amarela após a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é inversamente proporcional à quantidade de 17 $\beta$ -Estradiol presente na amostra biológica. Através da construção de uma curva-padrão é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio em amostras de soro ou plasma humano.

**Tempo total de incubação:** 2 horas e 30 minutos.

### 3. COMPONENTES DO KIT

- a. **MICROPLACA:** 1 placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, recobertos por anticorpos monoclonais anti-17 $\beta$ -Estradiol. Embalagem selada contendo dessecante.  
**Pronto para uso**
- b. **PADRÕES DA CURVA:** 1 mL de soro humano diluído em solução protéica tamponada contendo 17 $\beta$ -Estradiol nas concentrações:

PADRÃO A:	0	pg/mL	PADRÃO D:	300	pg/mL
PADRÃO B:	20	pg/mL	PADRÃO E:	600	pg/mL
PADRÃO C:	120	pg/mL	PADRÃO F:	2.000	pg/mL

**Prontos para uso**
- c. **CONJUGADO:** 12 mL de solução tampão contendo 17 $\beta$ -Estradiol conjugado à peroxidase. Contém estabilizantes e conservantes.  
**Pronto para o uso**

- d. **SUBSTRATO:** 12 mL de solução tamponada contendo tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).  
**Pronto para uso**
- e. **SOLUÇÃO DE PARADA 0,15 M:** 12 mL de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,15 M.  
**Pronto para uso**
- f. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades.
- g. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

#### 4. ARMAZENAMENTO

- Os reagentes e a Microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade determinada na etiqueta, se conservados entre 2 e 8 °C.
- As tiras não-utilizadas da Microplaca devem ser mantidas na embalagem original selada contendo o dessecante para a sua proteção contra a umidade e a luz.
- Não expor os reagentes à luz solar ou à luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o Substrato sempre ao abrigo da luz.

#### 5. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO-INCLUÍDOS NO KIT

- Água deionizada.
- Micropipetas calibradas para 10 a 200 µL e 200 a 1.000 µL e suas respectivas ponteiros descartáveis.
- Agitador tipo vórtex e papel absorvente.
- Cronômetro.
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300 µL.
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, a 620-630 nm.

#### 6. PRECAUÇÕES DE USO

O kit de **ESTRADIOL ELISA** é somente para o uso em **DIAGNÓSTICO IN VITRO**

##### MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os Padrões da Curva contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg e para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disto, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus HIV, da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.
- Precauções devem ser adotadas ao coletar, armazenar e manipular as amostras biológicas.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estiverem sendo manuseados.
- Não utilizar o produto após a data de validade.
- Não expor os reagentes à luz solar ou luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o Substrato sempre ao abrigo da luz.
- Evitar o contato do Substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas através da utilização de recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico (Solução de Parada) com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.
- Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental. Maiores informações, consultar as FISPQ dos produtos obtidas pelo e-mail [sac@btbiotec.com.br](mailto:sac@btbiotec.com.br) ou pelo telefone (11) 5093.2288.

## 7. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise. Para coleta do plasma, utilizar o anticoagulante EDTA ou Heparina.
- Amostras hemolisadas (“vermelhas”) e visualmente lipêmicas (“leitosas”) devem ser descartadas, pois podem gerar resultados falsos.
- Amostras que apresentem contaminação microbiológica evidenciada pela presença de filamentos, partículas fúngicas ou bacterianas, não devem ser utilizadas.
- As amostras biológicas devem ser refrigeradas de +2 a +8°C por até 5 dias ou congeladas a -20°C por até 30 dias. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento das amostras.
- Se após a refrigeração ou congelamento, as amostras apresentarem restos de fibrina, centrifugá-las anteriormente ao uso.

## 8. PROCEDIMENTO

### Operações Prévias

- Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit e amostras biológicas à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e homogeneizá-los suavemente.
- Deixar que a Microplaca atinja a temperatura ambiente (+15 a +30°C) antes de abrir a sua embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem contendo o dessecante. Retirar o ar da embalagem e fechá-la hermeticamente.
- Montar o protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras biológicas e dos Padrões da Curva na placa onde será realizada a análise. Seguir a orientação abaixo para dispensar os Padrões da Curva, as amostras biológicas e para preparar o Branco **SEMPRE EM DUPLICATA**.

Reagente	Posição
Branco	A1, B1
A	C1, D1
B	E1, F1
C	G1, H1
D	A2, B2
E	C2, D2
F	E2, F2
Amostras	A partir de G2

### Realização do Teste

- Dispensar 25 µL dos Padrões da Curva e das amostras biológicas nos respectivos poços da Microplaca (em duplicata).
- Adicionar 100 µL do Conjugado em cada poço da Microplaca, exceto nos poços A1 e B1 do Branco.
- Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. **Cobrir os poços com a folha adesiva e incubar a placa por 2 horas a +37°C.**
- Descartar o conteúdo de todos os poços por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL de água deionizada, aspirar ou decantar o líquido e repetir o processo por mais 2 vezes (total de 3 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
- Dispensar 100 µL do Substrato em todos os poços (inclusive no Branco) e agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. Cobrir novamente os poços com a folha adesiva e **incubar a placa por, exatamente, 30 minutos à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e ao abrigo da luz.**

- f. Adicionar 100 µL da Solução de Parada em todos os poços (inclusive no Branco), na mesma seqüência de adição dos reagentes. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos para a sua homogeneização.
- g. Ler a absorbância a 450 nm com o leitor de ELISA em, no máximo, 30 minutos. Usar os poços A1 e B1 como “Branco” para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do “Branco” de todos os valores medidos.

## 9. CONTROLE DE QUALIDADE

- A cada ensaio é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Para monitorar a performance do ensaio, é aconselhável incluir controles internos. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores devem ser determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter os registros de Controle de Qualidade para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou a degradação dos reagentes do kit. Reagentes novos devem ser usados para determinar a causa das variações.

## 10. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta (curva-padrão) usando os Padrões fornecidos no kit, é possível calcular a concentração de 17β-Estradiol nas amostras testadas. Isso pode ser feito com o auxílio de qualquer programa de computador que faça gráfico ou manualmente em papel milimetrado.

- a. Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada poço correspondente aos Padrões da Curva e amostras biológicas. Calcular o **Valor Médio (VM)** das absorbâncias das duplicatas através da fórmula:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

- b. Para construir a curva-padrão, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos Padrões da Curva e não o valor médio das duplicatas.
- c. Plotar em um gráfico as absorbâncias das duplicatas dos Padrões da Curva (eixo Y vertical) em função da concentração de 17β-Estradiol correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a curva-padrão.
- d. Determinar a concentração de 17β-Estradiol (em pg/mL) para cada amostra biológica, projetando a absorbância média das duplicatas sobre a curva-padrão.

## 11. VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência para 17β-Estradiol em soro ou plasma são:

Mulheres	
	pg/mL
<b>Fase Folicular</b>	30 – 100
<b>Pico Ovulatório</b>	130 – 350
<b>Fase Luteínica</b>	50 – 180
<b>Menopausa</b>	< 60

	pg/mL
<b>Homens</b>	< 60
<b>Crianças</b>	< 40

## 12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

### Performance do Ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados duvidosos, portanto, não devem ser utilizadas.
- As soluções do kit devem estar limpidas e dentro do prazo de validade.
- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes.
- Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções fornecidas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações.
- A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder a 10 minutos e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma seqüência.
- Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância na vertical. Desta forma, evitar tocar o fundo dos poços.
- Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC) através do telefone (11) 5093.2288 ou do e-mail [sac@btbiotec.com.br](mailto:sac@btbiotec.com.br), tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

### Interpretação

- O resultado obtido utilizando este kit é auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se às histórias clínicas dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo.
- Este método permite a determinação de 17 $\beta$ -Estradiol humano em amostras biológicas que possuem o intervalo de concentração do hormônio entre 20 e 2.000 pg/mL. Caso sejam quantificados valores superiores de 17 $\beta$ -Estradiol, diluir a amostra e considerar o fator de diluição durante o cálculo do resultado.
- O significado clínico da determinação de 17 $\beta$ -Estradiol pode se tornar inválido se o paciente estiver em tratamento com cortisona ou hormônios esteróides naturais ou sintéticos.

## 13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

### Sensibilidade

A sensibilidade do método, calculada por determinação da variabilidade entre dez réplicas do soro padrão (0 pg/mL) e utilizando 2 DP (95%) para calcular a dose mínima, foi de 15 pg/mL.

### Especificidade

A possibilidade de ocorrência de reação cruzada do anticorpo anti-17 $\beta$ -Estradiol foi calculada como a razão entre a dose da substância interferente e a dose de 17 $\beta$ -Estradiol necessária para obter-se a mesma absorbância. Em valores percentuais, quanto mais próximo de 100%, maior é a possibilidade da ocorrência de reatividade cruzada.

Substância	Reação Cruzada	Substância	Reação Cruzada
17 $\beta$ -Estradiol	100%	Cortisol	< 7 x 10 <sup>-3</sup> %
Estrona	2,0%	Progesterona	< 3 x 10 <sup>-4</sup> %
Estriol	0,39%	Dehidroepiandrosterona	< 1 x 10 <sup>-4</sup> %
Testosterona	0,02%		

## Precisão e Reprodutibilidade

Para determinar a precisão intra e inter-análise, foram testados *pool* de soros-controle com diferentes níveis de 17 $\beta$ -Estradiol. O Número de Amostras (N), Valores Médios (X), Desvios-Padrão (DP) e Coeficiente de Variação (CV) para cada soro-controle estão representados nas tabelas abaixo:

### Precisão Intra-análise (em pg/mL)

Amostra	N	X	DP	CV
Nível 1	16	147	12,72	8,6%
Nível 2	16	251	13,73	5,33%

### Precisão Inter-análise (em pg/mL)

Amostra	N	X	DP	CV
Nível 1	16	60,3	12,72	14,6%
Nível 2	16	154	15,66	10,16%
Nível 3	16	243	15,99	6,58%

N = experimentos em duplicata

## Análise Comparativa

O produto "Estradiol ELISA" foi comparado a um outro análogo disponível para comercialização no mercado que utiliza a metodologia de radioimunoensaio. Foram utilizadas amostras biológicas (N = 44 mulheres e 07 homens) contendo diferentes níveis de 17 $\beta$ -Estradiol. A Equação de Regressão e o Coeficiente de Correlação apresentados na Tabela abaixo, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

Equação de Regressão	Coeficiente de Correlação
$y = 6,16 + 0,886 (x)$	0,986

## 14. GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os produtos da BTI Bio Tecnologia Industrial Ltda são testados pelo Laboratório de Controle de Qualidade. A qualidade dos produtos é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

## 15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Joshi, U.M. et al., Steroids, 34(1), p.35, 1979.
- D. Exley and R. Abuknesha. Febs Letters, 91, p.162, 1978.
- Ismail, A.A., Niswender, G.D. and Midgley, A.R. J. Clin. Endocr. Metab., 34, p.177, 1972.
- Rajkowski, K.M. et al. Steroids, 29, p. 5, 1976.
- Sadem, D. et al. J. Immunol. Methods., 28, p.125, 1979.
- Wisdom GB, Clin Chem 22/8, 1243-1255 (1976).

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda**  
CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (11) 5093 2288 – [sac@btibiotec.com.br](mailto:sac@btibiotec.com.br)  
Av. José Cândido da Silveira 2.100 – sls 08, 10 e 18 - Horto  
Cep: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil  
**Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452.**

Registro na ANVISA: 8004957.0197

Código: IU 03/025  
Versão: 00  
Data de Revisão: 31/07/2008

VSG