

INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático para la determinación de niveles de testosterona en suero o plasma humano.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorios clínicos o de gabinete.

RESUMEN

La Testosterona (17-Betahydroxyandrost-4-eno-3-ona) es un esteroide C19 con un enlace insaturado entre C-4 y C-5, un grupo cetona en C- 3 y un grupo hidroxilo en la posición C-17. Esta hormona esteroide tiene un peso molecular de 288,4. La testosterona es el andrógeno más importante secretado en la sangre. En los individuos masculinos, la testosterona es principalmente secretada por las células Leydeg ubicadas en los testículos. En los individuos femeninos, aproximadamente un 50% de la testosterona circulante surge de la conversión periférica de Androstenediona, un 25% es secretada por los ovarios y el restante 25%, es secretada por las glándulas suprarrenales. La testosterona es responsable del desarrollo de características sexuales masculinas secundarias y su medición resulta útil en la evaluación de casos de hipogonadismo. En las mujeres, altos niveles de testosterona se encuentran generalmente en casos de hirsutismo y virilización, ovarios poliquísticos, tumores de ovario, tumores suprarrenales y la hiperplasia adrenal. En los hombres, los altos niveles de testosterona están asociados a las enfermedades de la unidad hipotálamo hipófisis, tumores testiculares, hiperplasia suprarrenal congénita y cáncer de próstata. Niveles bajos de testosterona pueden encontrarse en pacientes con las siguientes enfermedades: hipopituitarismo, feminización Síndrome Testicular, Síndrome de Klinefelter, orquiectomía y criptorquidia, defectos enzimáticos y algunas enfermedades autoinmunes. Los kits de evaluación de testosterona han sido diseñados para la medición de Testosterona Total en suero humano.

DESCRIPCION

La testosterona inmunoenzimática está basada en un principio de competición entre la testosterona encontrada en la muestra y la testosterona HRP conjugada por una constante unión de anticuerpos de conejo de anti-testosterona. En la incubación anticuerpos anti-conejo IgG marcados a los pozos son incubados con 10 µl de estándares de testosterona, controles y sueros de pacientes, 100µlde testosterona-HRP del reactivo conjugado y 50 µl anticuerpos de conejo anti-testosterona durante 90 minutos a 37°C durante la incubación, la fijación de HRP de testosterona completos de los estándares, muestras y controles debido a la especificidad de los sitios de unión de los anticuerpos anti-testosterona, por lo tanto, la cantidad de testosterona aumenta en la muestra, sin testosterona peroxidasa conjugada se quita y se lavan los pozos, enseguida la solución TMB es añadida e incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, lo resultante del mecanismo es una coloración azul, enseguida se añade la solución de paro y se lee con un espectrofotómetro a 450 nm.

RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

1. Recolecte sangre por venopunción y separe el suero de inmediato.
2. En caso de no llevar a cabo el examen inmediatamente, refrigere la muestra a (2-8°C) por cinco días. En caso de exceder dicho plazo, congele a -20°C hasta un mes.
3. Evite múltiples ciclos de congelación - descongelación.
4. Previo al ensayo, la muestra deberá ser debidamente descongelada y mezclada.
5. Evite utilizar muestras con exceso de lípidos.
6. Nota: No deben utilizarse muestras que contengan ácido de sodio.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. 1 plato pozos IgG.	1
2. Estándares: 6 viales.	0.5 ml.
3. Anti-testosterona Biotina.	7 ml
4. Enzima conjugada conc. 20X.	0.7 ml.
5. Buffer diluyente.	12 ml.
6. Solución de lavado 20X.	25 ml.
7. Sustrato TMB.	12 ml.
8. Solución de paro.	12 ml.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO PROVISTOS

1. Agua destilada o desionizada.
2. Pipetas de precisión.
3. Puntas de pipetas desechables.
4. Lector Microelisas con lente a 450nm de longitud de onda con una banda de amplitud de 10 nm o menor y un rango de densidad óptica de 0-2 OD o mayor.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Papel cuadrículado.

ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit a una temperatura de entre 2°C a 8°C.
2. Mantenga las tiras de los pocillos selladas en la bolsa de aluminio.
3. Todos los compuestos son estables hasta su fecha de expiración siempre y cuando las condiciones de almacenaje sean estrictamente llevadas a cabo como aquí se indica.
4. No exponga los reactivos al calor, luz solar o intensa luz eléctrica.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Potencial de los materiales de riesgo biológico: Los calibradores contienen componentes de origen humano, que se han sido probados y encontrados no reactivos para el antígeno de superficie de hepatitis B y anticuerpos contra el VIH Aprobado por la FDA. Sin embargo no hay método de prueba que puede ofrecer completa seguridad de que el virus VIH, Hepatitis B u otros agentes infecciosos estén presentes. Estos reactivos deben ser manejados según el Nivel de Bioseguridad 2, como se recomienda en los Centros para el Control de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud manuales. "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos" 1984.
2. No pipetee con la boca. No fume, coma, o beba en el área donde maneje este equipo.
3. Los componentes en este equipo son para uso como una unidad integral. Los componentes de diferentes lotes no se deben mezclar.
4. Es recomendable que los estándares, controles y muestras de suero se corran por duplicado.
5. Para obtener óptimos resultados, debe apegarse estrictamente al protocolo. Pipeteado exacto y preciso, así como después de la hora exacta y requerimientos de temperatura prescritos son esenciales. Cualquier desviación de este pueden dar datos no válidos.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. **CONJUGADO ENZIMÁTICO 20X:** Prepare 1X de solución de trabajo a 1:20 con el diluyente de ensayo. (Ej. Agregue 0.1 ml de Conjugado Enzimático de Testosterona a 1.9 ml de diluyente de ensayo).
2. **SOLUCION DE LAVADO:** Prepare una solución de lavado 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o desionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-26°C).

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Previo al ensayo, todas las muestras y reactivos deben ser llevados a temperatura ambiente (18-26°C). Mezcle gentilmente todos los reactivos previo a su uso.

1. Corte el número de pozos a utilizar. Cierre y selle el resto de los pozos no utilizados y refrigérelos a 2-8°C.
2. Dispensar 50 µl de los estándares, control y muestras en los pozos designados.
3. Agregar 100 µl del conjugado enzimático de trabajo en cada pozo.
4. Agregar 50 µl Reactivo Anti-Testosterona Biotín en cada pocillo. Mezclar gentilmente durante 20-30 segundos.
5. Agitar suavemente la microplaca por 20-30 segundos para mezclar los reactivos.
6. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por 60 minutos.
7. Remover el líquido de los pozos. Lave en tres tiempos con 300 µl de solución de lavado 1x. Golpee los pozos sobre una toalla o papel absorbente.
8. Agregar 100 µl de sustrato TMB en cada pozo.
9. Cubrir e incubar a temperatura ambiente (18-25°C) por 15 minutos.
10. Frenar la reacción agregando 50 µl de Solución de Frenado a cada pozo. Agitar gentilmente por 15-20 segundos para facilitar el mezclado.
11. Lea la densidad óptica a 450nm con un lector de placa de micro valoración en un plazo de 15 minutos después de haber agregado la solución de frenado.

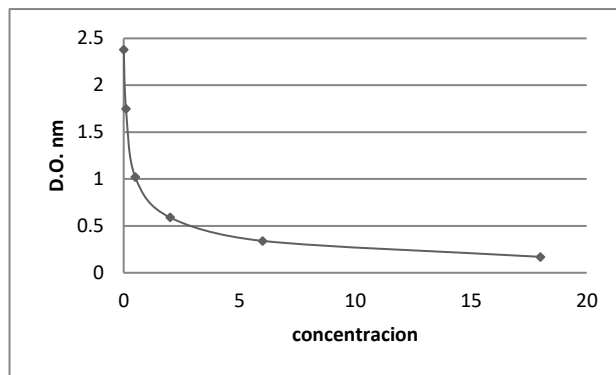
CÁLCULO DE RESULTADOS

La curva estándar se construye de la siguiente manera:

1. Calcule el valor de absorbancia media en cada vial estándar. Este valor puede variar de lote a lote. Asegúrese de chequear los valores en cada kit. Tome el ejemplo de estándar adjunto como referencia.
2. Para la construcción de la curva trazar la lectura de absorbancia de los estándares de referencia en eje vertical contra su concentración en eje horizontal en papel gráfico lineal, dibujar la curva de mejor manera posible uniendo los puntos.
3. Utilice los valores de absorbancia media de cada muestra para determinar la correspondiente concentración de Testosterona en ng/ml de la curva estándar.
4. Aquellos valores obtenidos de muestras diluidas deberán ser convertidos aplicando el correspondiente factor de dilución en los cálculos.

Ejemplo de Curva Estandar

Testosterona (ng/ml)	Absorbancia (450 nm)
0	2.50
0.2	2.36
0.5	1.88
2.0	0.93
6.0	0.37
18.0	0.15



VALORES ESPERADOS

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios rangos normales sobre la base de una muestra representativa de la población local. Los siguientes valores de Testosterona pueden ser utilizados solo como guía:

-Hombres: Pre Pubertad (tardía): 0.1 – 0.2 ng/ml; Adultos: 3.0 – 10.0 ng/ml.

-Mujeres: Pre Pubertad (tardía): 0.1 – 0.2 ng/ml; Fase Folicular: 0.2 – 0.8 ng/ml; Fase Lútea: 0.2 – 0.8 ng/ml, post menopausia: 0.08 – 0.35 ng/ml

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

1. No utilice ácido de sodio como preservante ya que inhibe la actividad de la enzima HRP.

REFERENCIAS

1. Chen, A., Bookstein, J.J., Meldrum, D.R., Diagnosis of a testosterone-secreting adrenal adenoma by selective venous catheterization. *Fertil. Steril.* 1991; 55: 1202-1203.
2. Granoff, A.B. and Abraham, G.E., Peripheral and adrenal venous levels of steroids in a patient with virilizing adrenal adenoma. *Obstet. Gynecol.*, 1979; 53:111-115.
3. Bricaire, C., Raynaud, A., Benotmane, A., et al., Selective venous catheterization in the evaluation of hyperandrogenism.