

Bio-Testosterona Libre

Inmunoensayo enzimático para la cuantificación de la Hormona Testosterona libre en suero o plasma.

INTENCIÓN DE USO

El kit Testosterona Libre ELISA se utiliza para la determinación cuantitativa de Testosterona Libre en suero o plasma humano.

RESUMEN

La Testosterona es una hormona esteroide del grupo andrógeno. En los individuos masculinos, la testosterona es principalmente secretada por las células Leydig ubicadas en los testículos. En los individuos femeninos es secretada principalmente por los ovarios, y en menor medida por las glándulas suprarrenales. La testosterona es la principal hormona sexual masculina, es un anabólico esteroide y, tanto para hombres como para mujeres, juega un rol importante en la salud y bienestar general. En la circulación sanguínea la Testosterona se encuentra unida a proteínas, dentro de las cuales la más importante es la Globulina fijadora de hormonas sexuales (SHGB). La medición de Testosterona Libre o su fracción no unida en suero ha sido propuesta como un medio de estimar la hormona fisiológicamente bioactiva. Los niveles de Testosterona Libre se observan elevados en mujeres con hiper androgenismo asociado con hirsutismo en la presencia o ausencia de ovarios poli císticos. En suma, la medición de Testosterona Libre puede ser de mejor ayuda que la medición de Testosterona Total en situaciones donde la SHGB se incrementa o decrece (ej. Hipotiroidismo y obesidad).

PRINCIPIO DEL ENSAYO

El kit Testosterona ELISA está basado en un principio de unión competitiva entre la Testosterona encontrada en la muestra y el conjugado Testosterona-HRP conjugada por cantidad constante de anticuerpos Anti-Testosterona de conejo. En la incubación, los micropozos recubiertos con anticuerpos de cabra anti-Testosterona de conejo, son incubados con 25 µl de estándares de Testosterona, controles y muestras del paciente; y con 50 µl del conjugado Testosterona-HRP y con 50 µl del reactivo de conejo anti-Testosterona Libre, durante 60 minutos a temperatura ambiente. Durante la incubación, una cantidad fija de HRP-Testosterona marcada, compete con la Testosterona endógena de los estándares, muestras y controles, por un número fijo de sitios de unión al anticuerpo específico de Testosterona. Así, la cantidad de conjugado Testosterona-peroxidasa inmunológicamente unido al micropozo decrece progresivamente, mientras que la concentración de testosterona en la muestra aumenta. El conjugado Testosterona-peroxidasa no unido es retirado y los micropozos lavados. Seguidamente, se agregan 100 µl de solución TMB y se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos, resultando en una coloración azul. Dicha coloración es interrumpida con la adición de 50 µl solución de frenado y la absorbancia es medida y se lee con un espectrofotómetro a 450 nm.

MATERIALES PROVISTOS	96 Pruebas
1. Micropozos recubiertos con Anti-IgG-Conejo de Cabra	12x8x1
2. Estándares: 6 viales (listos para su uso)	0.5 ml
3. Conjugado Enzimático: 1 frasco (listo para su uso)	7 ml
4. Reactivo Anti-Testosterona (Conejo): 1 frasco (listo para su uso)	7 ml
5. Sustrato TMB: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
6. Solución de Frenado: 1 frasco (listo para su uso)	12 ml
7. Solución de Lavado Concentrado 20X: 1 frasco	25 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 450 nm 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 cuadriculado.

ALMACENAMIENTO

1. Almacene el kit a 2 - 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.

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.

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

SOLUCIÓN DE LAVADO: Prepare una solución de lavado a 1X, adicionando el contenido de la botella (25 ml, 20 X) a 475 ml de agua destilada o des ionizada. Conserve a temperatura ambiente (18-26° C).

LIMITACIONES DE LA PRUEBA

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

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 previos 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 25 µl de los estándares, control y muestras en los pozos designados.
3. Agregar 50 µl del reactivo Anti-Testosterona en cada pozo.
4. Agregar 50 µl del conjugado enzimático de Testosterona en cada pozo.
5. Agitar suavemente la microplaca por 10 segundos para mezclar los reactivos.
6. 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 a 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.
11. Lea la densidad óptica a 450 nm 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 grafico 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 Libre 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 Standard

	OD 450 nm	Conc. pg/mL
Std 1	2.762	0
Std 2	1.528	0.15
Std 3	0.903	1.5
Std 4	0.468	8
Std 5	0.140	25
Std 6	0.075	60

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 Libre pueden ser utilizados solo como guía:

	Edad	Conc. Rango
Hombres	Adulta	5 - 30
Mujeres	Adulta	0 - 3
Niños	1 - 10	0.1 - 1.25

PERFORMANCE

1. Correlación con un kit ELISA de referencia:

Un total de 74 muestras de suero fueron analizadas utilizando el presente kit ELISA y otro kit de referencia. La curva de regresión lineal fue calculada de la siguiente manera:

$$Y = 1.1x + 0.111, r = 0.97$$

2. Precisión:

Intra Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	24	1.62	0.093	5.76
2	24	7.47	0.439	5.88
3	24	14.03	0.692	4.93

Inter Ensayo

Suero	No. de Réplicas	Media	Desvío Estandar	Coficiente de Variación (%)
1	16	1.71	0.117	6.87
2	16	7.67	0.288	3.75
3	16	14.67	0.908	6.19

3. Sensibilidad:

La sensibilidad de esta prueba resulta de calcular la media más dos desvíos estándar del punto de estándar cero, veinte veces en la misma prueba.

Suero	No. de Replicas	Media pg/ml	Desvío Estándar	Media + 2SD (Sensibilidad) pg/ml
Zero standar	20	0.014	0.022	0.057

La reactividad cruzada al anticuerpo calculada al método del 50%, de acuerdo con Abraham, se exhibe en el siguiente cuadro:

Analito	% Reactividad Cruzada
Testosterona	100
Androstenediona	<0.1
Cortisona	<0.1
Androsterona	<0.1
DHEA-S	<0.1
Cortisol	<0.1
17β Estradiol	<0.1
Estrona	<0.1
Prednisona	<0.1
Norgestrel	<0.1
17β Ethynilestradiol	<0.1

REFERENCIAS

1. McCann D, Kirkish L. Evaluation of Free Testosterone in serum. J.Clin. Immunoassay 1985; 8:234-236.
2. Ekins R.P. Free hormones in blood J. Clin. Immunoassay 1984; 7(2): 163-180.
3. Paulson JD, et al. Free Testosterone concentration in serum: elevation is the hallmark of hirsutism. Am.J.Obst. Gynecol 1977; 128:851-857.
4. Odland V. et al. Plasma androgenic activity in women with acne vulgaris and in healthy girls before, during and after puberty. Clin.Endocrinology 1982; 16:243-249.
5. Green PJ. Free Testosterone determination by ultrafiltration and comparison with dialysis. Clin.Chem. 1982; 28:163-180.
6. Wu Ch. Plasma free and protein-bound testosterone in hirsutism. Obstet.Gynecol 1982; 60:188-194.
7. Abraham, G.E. (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17b. /clin. Endocr.Metab. 29, 866-870.