

### INDICACIONES DE USO

Ensayo inmunoenzimático por quimioluminiscencia para la medición cuantitativa de testosterona (TEST) en suero humano.

Agente de diagnóstico in vitro, para uso exclusivo de laboratorio clínico o de gabinete.

### DESCRIPCIÓN

En el ensayo TEST CLIA el estándar de testosterona o el suero del paciente es incubado con anticuerpo de testosterona y con testosterona-peroxidasa equina conjugado en el pocillo impregnado con anti-conejo testosterona. En este sistema de fase sólida, anticuerpo adherido de testosterona permanecerá en el pocillo mientras que la no adherida será eliminada por lavado. Una reacción quimioluminiscencia se desarrolla cuando el sustrato de CLIA es mezclado con el anticuerpo de la testosterona adherida con peroxidasa equina. La unidad de luz relacionada (RLU) es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversa a la cantidad de testosterona des etiquetada en la muestra.

### RESUMEN Y APLICACIÓN

La testosterona es una hormona esteroidea del grupo de los andrógenos. En hombres, la testosterona juega un papel importante en el desarrollo del tejido reproductivo masculino tal como los testículos y la próstata, así como también promoviendo los caracteres sexuales secundarios tales como el incremento de la musculatura, la masa ósea y el crecimiento del vello corporal. Generalmente el cuerpo de un hombre adulto produce cerca de 10 veces más testosterona que el cuerpo de una mujer adulta, pero las mujeres son más sensibles a la hormona. En mujeres, es necesaria para el balance hormonal y para ayudar a que su cuerpo funcione normalmente, si el cuerpo de una mujer está produciendo mucha testosterona, ella puede tener más vello corporal del normal y periodos menstruales anormales, carecer de ellos o ser infértiles. Hay varios factores que pueden afectar los niveles de testosterona de un individuo. Las pruebas de testosterona son usadas para diagnosticar varias condiciones en el hombre, mujer y niños. Estas condiciones incluyen tumores testiculares en hombres, desórdenes en el hipotálamo o pituitaria, hirsutismo y virilización en niñas y mujeres. Un número de métodos para detectar testosterona usada por atletas ha sido empleada, la mayoría basada en orina. En muchos programas de evaluación, los registros de resultados de individuos pueden servir como un intervalo de referencia para la interpretación de un resultado sospechoso. Otra aproximación que se está investigando es la detección de la forma administrada de la testosterona.

### CONTENIDO

Kit para la determinación de 96 pruebas:

1. Placa con 96 pozos.
2. Enzima conjugada 1 vial con 5.5 ml.
3. 6 calibradores con 1 ml: 0, 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 20.0 ng/ml.
4. Sustrato A 6.0 ml.
5. Sustrato B 6.0 ml.
6. Control 1 y 2 liofilizado 1 ml c/u.
7. PBS -T en polvo (buffer de lavado, 2 bolsas 5g).
8. 1 bolsa zip-plock.
9. 2 piezas de papel auto-adherible.
10. Instructivo de uso.
11. Anticuerpo anti-testosterona en solución 5.5 ml.

### MATERIALES REQUERIDOS, PERO NO SUMINISTRADOS

1. Pipetas de precisión y puntas, 0.1 ml, 0.025 ml, 0.05 ml.
2. Agua destilada.
3. Tubos de vidrio o frascos para mezclar sustrato A y B.
4. Papel absorbente o una toalla de papel.
5. Papel para gráfica logarítmica.
6. Un Luminómetro.

### ALMACENAMIENTO DE EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN

1. El equipo sin abrir debe guardarse a una temperatura de entre 2°C-8°C a partir de la recepción y la placa debe guardarse en una bolsa sellada con desecantes para minimizar la exposición a la humedad del aire. El equipo se puede utilizar hasta la fecha de caducidad de la etiqueta.
2. El equipo abierto se mantendrá estable hasta que expire la fecha indicada, siempre y cuando se almacene según lo estipulado anteriormente.
3. Los calibradores una vez reconstituidos y almacenados entre 2-8°C permanecerán estables durante 2 meses, para usar por mayor tiempo utilice alícuotas y almacene a -20°C. Evite múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento.

### RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. La sangre debe extraerse usando técnicas estándar de venopunción y el suero debe ser separado de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible. Evite muestras excesivamente hemolizadas, lipémicas o turbias.
2. Las muestras deberán ser niveladas y se pueden almacenar hasta 48 horas de 2-8 °C, antes de ensayo. Los especímenes retenidos para un tiempo más largo pueden ser congelados a -20°C. Los especímenes deben ser mezclados antes de la prueba.

### PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Permita que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (18-25°C) antes de su uso. Todos los reactivos deben mezclarse suavemente por inversión o agitación antes de su uso. No inducir la formación de espuma.
2. Para preparar Buffer de Lavado: añadir 1 bolsa de PBS-T a 500 mL de agua destilada y mezclar bien. La solución de lavado es estable a temperatura ambiente por 2 meses.
3. Para preparar el sustrato de trabajo: mezclar suavemente el sustrato A y B en proporción de 1:1, 20 minutos antes de usarla. El preparado de sustrato de trabajo (después de la mezcla) es estable a temperatura ambiente, en la oscuridad, durante 12 horas. Descartar el exceso después de cada uso.
4. Reconstituya cada control y calibradores con 1 ml de agua destilada y mezcle bien. Permita reposar al menos 10 minutos.

### PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Utilice el número deseado de micropozos.
2. Agregue 25 µl de calibradores, controles o muestras al pocillo asignado.
3. Agregue 50 µl de solución anti-testosterona a cada pocillo.
4. Agregue 50 µl de enzima conjugada a cada pocillo.
5. Agite la placa suavemente por 30 segundos. Cubra la placa con el papel adherente e incube a temperatura ambiente por 60 minutos. Deseche el contenido de los pocillos por decantación o aspiración. Si decanta, golpee la placa sobre papel absorbente. Lavar cada micropozo 5 veces con 350 µl de solución de lavado, golpear la placa sobre papel absorbente para eliminar las gotas de solución residual.
7. Agregue 100 µl de la mezcla de sustrato A y B a cada pocillo.
8. Ingrese la placa en el cuarto de detección de un Luminómetro e incube a completa oscuridad por 5 minutos, después lea los valores de RLU's de cada pocillo.

### NOTAS IMPORTANTES

1. El procedimiento de lavado es fundamental. La insuficiencia de lavado se traducirá en mala precisión y lecturas de absorbancia falsamente elevadas.
2. Se recomienda que no más de 32 pozos sean utilizados para cada ensayo, si el pipeteado es manual, ya que los especímenes y los controles deben ser completados dentro de 5 minutos. Una placa de 96 pocillos puede utilizarse si el pipeteado es automático.
3. La duplicación de todos los estándares y especímenes, aunque no es obligatorio, se recomienda.

### CÁLCULO DE RESULTADOS

Registre todos los RLU's obtenidos. Calcule la media de los RLU's si utilizo duplicados y utilice esta media para los siguientes cálculos:

$$qB = \text{RLU CAL B/RLUCAL A}, qC = \text{RLU CAL c/RLU CAL A}, \\ qD = \text{RLU CAL D/RLU CAL A}, qE = \text{RLU CAL E/RLU CAL A}.$$

Grafique los logaritmos de qB a qE contra el logaritmo común de las concentraciones en ng/mL de cada calibrador. Dibuje una línea delgada entre los puntos graficados en papel gráfico lineal. Si utiliza computadora seleccione el método de curva con función de regresión lineal. Para determinar la concentración de testosterona de una muestra, localice el logaritmo de qB a qE para cada muestra en el eje vertical (Y) en el gráfico, encuentre el punto de intersección en la curva y lea el logaritmo común de la concentración del eje horizontal (X) en el gráfico. Si una computadora es usada, para determinar la concentración de testosterona de una muestra, ingrese el logaritmo de qB a qE para cada muestra y obtenga el logaritmo común de la concentración.

### VALORES DE REFERENCIA

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos normales sobre la base de población de pacientes. Los resultados mostrados abajo fueron tomados en un laboratorio con muestras de pacientes tomadas al azar.

#### Testosterona (ng/mL)

	Rango
Hombre	2.8 - 12.0
Mujer	0 - 1.8

La concentración mínima detectable de testosterona humana para este ensayo se estima que es de 0.1 ng/mL.

### LIMITACIONES

Anticuerpos heterófilos y factores reumatoides en las muestras pueden interferir con los resultados de la prueba. Pacientes rutinariamente expuestos a animales o a componentes del suero animal pueden ser propensos a esta interferencia y valores anormales pueden ser observados. Información adicional puede ser requerida para el diagnóstico. Este tipo de muestras no es recomendable para ser probada por este ensayo.

### PERFORMANCE

#### 1. Precisión:

Este ensayo está diseñado para tener una precisión Intra-ensayo de <10%. 2 sueros humanos (alto y bajo) fueron probados, usando 1 lote de reactivos con 20 repeticiones. Los datos del estudio fueron registrados en la siguiente tabla:

Muestra	Lote	n	Media	SD	%CV
1	1	20	1.74	0.1	5.75
2	1	20	9.31	0.39	4.19

Este ensayo fue diseñado para tener una precisión inter-ensayo de <15%. 2 sueros humanos (alto y bajo) fueron probados, usando 3 lotes de reactivos, con 2 repeticiones, una vez por día durante 20 días de prueba. Los datos de este estudio fueron registrados en la tabla siguiente:

Muestra	n	Media	SD	%CV
1	120	2.23	0.21	9.55
2	120	8.79	0.81	9.72

#### 2. Sensibilidad analítica:

La sensibilidad analítica definida como la concentración correspondiente a la media de los RLU's de 10 repeticiones del estándar A menos 2 desviaciones estándar, es de  $\leq 0.25$  ng/ml.

### 3. Especificidad analítica:

Este ensayo está diseñado para no tener reactividad cruzadas con las sustancias enlistadas debajo, con los niveles de concentración enlistados, en buffer PBS con 3% de BSA.

Substancias Interferentes	Concentración pg/ml
Progesterona	30
Estradiol	1000

### MEDICIÓN DE PRECISIÓN POR CORRELACIÓN

Un estudio fue realizado donde las muestras fueron probadas usando este ensayo y una prueba de testosterona por ELISA, las cuales están actualmente en el Mercado. Los datos fueron analizados y registrados en la tabla siguiente:

Método de correlación	n	Intercepto	Pendiente	Coefficiente de correlación
Regresión lineal	180	0.089	0.9383	0.9687

### REFERENCIAS

1. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr. Rev.* 1987; 8(19): 1-28.
2. Strahm E, Emery C, Saugy M, Dvorak J, Saudan C. Detection of testosterone administration based of carbon isotope ratio profiling of endogenous steroids: international reference population of professional soccer players. *Br J Sports Med.* 2009; 43(13): 1041-1044.
3. Kicman AT, Cowan DA. Subject-based profiling for detection of testosterone administration in sports. *Drug Test Anal.* 2009; 1(1): 22-24.
4. Pozo OJ, Deventer K, Van Eenoo P, Rubens R, Delbeke FT. Quantification of testosterone undecanoato in human hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2009; 23(8): 873-880.