

Reactivo para la Determinación de la Hormona de la Testosterona

Solo para diagnóstico In Vitro

Para uso exclusivo en laboratorios clínicos o de gabinete
Conservar entre 2°C a 8°C

INTRODUCCIÓN

La Testosterona (17 β -hidroxiandrost-4-en-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 de Leydig 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, altos niveles de testosterona están asociados a enfermedades pituitario hipotalámico, tumores testiculares, hiperplasia suprarrenal congénita y cáncer de próstata.

Niveles bajos de testosterona pueden encontrarse en pacientes con las siguientes enfermedades: hipopituitarismo, síndrome de Klinefelter, feminización testicular, 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.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA

La prueba de testosterona EIA está basada en el principio competitivo entre la testosterona en la muestra y el conjugado de testosterona-HRP por un constante aumento en la cantidad de anti-testosterona de conejo. En la incubación los pozos recubiertos de cabra anti-IgG de conejo son incubados con 10 μ L de estándar de testosterona, controles, muestras del paciente, 100 μ L de testosterona-HRP reactivo conjugado con 50 μ L de reactivo anti-testosterona de conejo a 37° C por 90 minutos.

Durante la incubación un aumento fijado de HRP-etiquetado de testosterona establece una competencia con la testosterona endógena, en él estándar, muestra o control de calidad del suero para fijar un número de sitios unidos en el anticuerpo específico de la Testosterona. Esto, así como el aumento del conjugado peroxidasa de Testosterona, inmunológicamente se une en el micro pozo para determinar la concentración presente en las muestras.

Las no-unionnes del conjugado peroxidasa de testosterona son ahora removidas de los micro pozos por medio de los lavados. Al agregar el reactivo TMB, éste es responsable de dar el color azul en una incubación a temperatura ambiente por 20 minutos. El desarrollo del color es detenido

al adicionar la solución de paro (HCl) y la absorbancia es medida a 450 nm. La intensidad del color que se forme es proporcional a la cantidad de enzima presente e inversamente proporcional a la cantidad de testosterona en la muestra. La curva estándar es obtenida al graficar la concentración contra la absorbancia. La concentración de Testosterona de la muestra y al correr los controles con el estándar, puede ser calculada de la curva estándar.

REACTIVOS

Materiales abastecidos con el equipo de prueba

1. Placa de micropozos cubiertos de Cabra Anti-Conejo IgG, 96 pozos
2. Estándares de referencia de Testosterona, que contienen 0, 0.1, 0.5, 2.0, 6.0 y 18 ng/mL. Líquido. Listo para usarse
3. Reactivo Anti-Testosterona. 1 Frasco
4. Reactivo Conjugado de Testosterona-HRP. 1 Frasco
5. Reactivo TMB. 1 Frasco
6. Solución de paro. 1 Frasco
7. Solución de lavado concentrado. 1 Frasco
8. Juego de controles (opcional)

Materiales requeridos pero no abastecidos

1. Pipetas de precisión: 10 μ L, 50 μ L, 100 μ L y 1.0 mL
2. Puntas para pipeta desechables.
3. Agua destilada o desionizada.
4. Mezclador Vórtex.
5. Papel absorbente o toalla de papel.
6. Lector de Microplaca.

RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

1. Solo muestras séricas son usadas en este test. Las muestras no requieren ningún pre-tratamiento.
2. Las muestras de suero deben de ser almacenadas de 2-8 °C hasta por 24 horas y deben ser congeladas a -10 °C o menos para períodos más prolongados. No use muestras hemolizadas densamente o con lipemizado grueso.
3. *Nota: Por favor, no use muestras que contenga azida de sodio en éste ensayo.*

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

1. Todos los reactivos deben encontrarse a temperatura ambiente (18-25 °C) antes de su uso.
2. Muestras con concentraciones esperadas de Testosterona arriba de 18 ng/mL. Pueden ser cuantificadas por dilución, con diluyente de testosterona.
3. Solución de lavado (1X). Diluir un volumen de solución de lavado concentrado (50X) en 49 volúmenes de agua destiladas. Por ejemplo, diluir 15 mL de solución de lavado concentrado (50X) en 735 mL de agua destilada para preparar 750 mL de solución de lavado (1X). Mezcle bien antes de su uso.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1. Asegurar el número de pozos deseados en el soporte.
2. Dispensar 10 μ L de los estándares, muestras y controles en los po-



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

Distribuido por:

DIAGNÓSTICA INTERNACIONAL S.A. de C.V.
Rudyard Kipling 4886 Col. Jardines de la Patria
CP 45110 Zapopan, Jalisco, México
Lada sin costo: 01 800 440 0404 c/ 10 líneas
Tel: 01 (33) 3770 1940 c/ 10 líneas

zos apropiados.

3. Dispensar 50 µL de Reactivo anti-Testosterona de conejo en cada pozo.
4. Mezcle agitando suavemente por 30 segundos. **Es muy importante que el mezclado sea completo.**
5. Dispensar 100 µL del Reactivo Conjugado de Testosterona HRP en cada pozo.
6. Incubar a 37°C por 90 minutos.
7. Lave y enjuague la microplaca 5 veces con solución de lavado (1X).
8. Agregar 100 µL de Reactivo TMB dentro de cada pozo. Mezclar cuidadosamente por 10 segundos.
9. Incubar a Temperatura ambiente (18-22°C) durante 20 minutos.
10. Para detener la reacción agregue 100 µL de solución de paro a cada pozo.
11. Mezcle cuidadosamente por 30 segundos. **Es importante asegurar que todo el color azul cambie al amarillo completamente.**
12. Lea la densidad óptica a 450 nm con un lector de micro pozos **dentro de un lapso de 15 minutos.**

NOTA IMPORTANTE:

1. El procedimiento de lavado es crítico. Un lavado insuficiente puede tener poca precisión y absorbancias elevadamente falsas.
2. Si existen burbujas dentro de los pozos, se crearan lecturas falsas. De favor utilice agua destilada para remover las burbujas antes de agregar el sustrato.

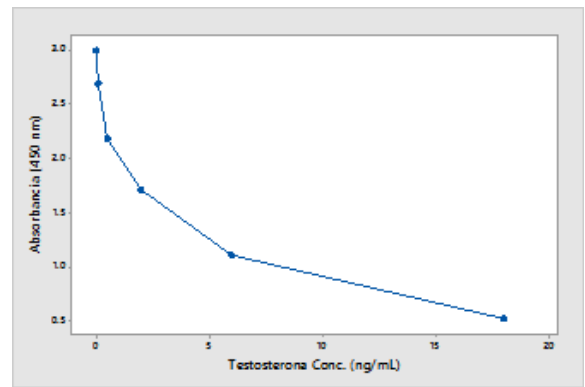
CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

1. Calcule los valores de absorbancia media (A_{450}) para cada juego de estándares de referencia, control, y muestras del paciente.
2. Elabore una curva estándar al trazar la absorbancia media obtenida para cada estándar de referencia comparada con su concentración en ng/mL sobre el papel cuadrícula, con los valores de absorbancia sobre el eje vertical (Y) y las concentraciones sobre el eje horizontal (X).
3. Utilice el valor de absorbancia media para cada muestra para determinar la concentración correspondiente de Testosterona en ng/mL desde la curva estándar.
4. En las muestras diluidas el resultado debe ser corregido por el factor de dilución apropiado.

EJEMPLO DE CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de una corrida estándar típica con lecturas de densidad óptica a 450 nm mostradas en el eje (Y) contra las concentraciones de Testosterona mostradas en el eje (X). Esta curva estándar es con el propósito de ilustrar solamente, y no debe ser utilizada para hacer cálculos desconocidos. Cada usuario debe obtener sus propios datos y curva estándar en cada experimento.

Testosterona (ng/mL)	Absorbancia (450 nm)
0.0	2.998
0.1	2.700
0.5	2.185
2.0	1.709
6.0	1.105
18.0	0.516



VALORES ESPERADOS Y SENSIBILIDAD

Cada laboratorio deberá establecer sus propios rangos normales según la población de pacientes. La prueba de testosterona EIA fue seleccionada al azar de muestras clínicas de pacientes externos. Los resultados de estas determinaciones son las siguientes:

Hombres:

Prepubertad (tardía)	0.1- 0.2 ng/mL
Adulto	3.0-10.0 ng/mL

Mujeres:

Prepubertad (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

La concentración mínima detectable de este ensayo de EILISA para Testosterona a través de 2SD de la media del estándar cero esta estimado en 0.05 ng/mL.

APLICACIÓN CLÍNICA

HOMBRES

En hombres, la determinación de testosterona es utilizada como un indicador para la función de pruebas: bajos niveles hormonales han sido encontrados en casos con síndrome de Klinefeter, criptorquidismo o anorquia. Hombres con deficiencia en testosterona con frecuencia presentan síntomas, tales como: disminución de libido, disminución de la fuerza muscular, ginecomastia e infertilidad.

MUJERES

1.- Desordenes:

La medición de la testosterona son utilizados frecuentemente en la evaluación de desordenes virilizantes. las concentraciones de testosterona >2.0 ng/mL pueden indicar secreciones ováricas andrógenas o neoplasma suprarrenal.

2.- Monitoreo de drogas supresoras de androgenos

La medición de la testosterona puede ser utilizada en mujeres para ajustes de drogas supresoras de andrógenos y sus dosis.

3.- Embarazo:

Concentraciones de testosterona son relativamente constantes durante el embarazo.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Existen algunas limitaciones del ensayo:

1. Como en todas las pruebas de diagnóstico, un diagnóstico clínico definitivo no debe basarse en los resultados de una sola prueba, pero

-
- solo debe hacerse por el médico después de que todo lo clínico y los resultados de laboratorio han sido evaluados.
2. Estudios han implicado a posibles interferencias en los resultados del inmunoensayo en algunos pacientes con anticuerpos antinucleares y factor reumatoide conocido. Muestras de suero de pacientes que han recibido infusiones que contienen anticuerpos monoclonales de ratón con fines diagnósticos o terapéuticos, puede contener anticuerpos a la proteína de ratón (HAMA). Aunque hemos añadido algunos agentes para evitar las interferencias, no podemos garantizar que se eliminarán todas.
 3. Cuando el procedimiento del ensayo se lleva a cabo con una completa comprensión de las instrucciones del envase e inserto y con cumplimiento de buenas prácticas de laboratorio, se obtendrán resultados fiables y reproducibles.
 4. Sueros que presente una fuerte lipemia, hemólisis o turbidez no deben usarse en esta prueba.

REFERENCIAS

1. *Chen A., Bookstein J.J., Meldrum D.R., Diagnosis of a testosterone-secreting adrenal adenoma by selective venous catheterization. FI 1991. 55: 1202-1203*
2. *Granoff A.B. and Abraham G.E., Peripheral and adrenal venous levels of steroids in a patient with virilizing adenoma. Obstet. Gynecol. 53: 111, 1979; 53: 111-115*
3. *Bricaire C., Raynaud A., Benotmane A., Clair F., Paniel B., Mowszowicz I., Wright F., Moreau J.F., Kutten F., Mauvais-Jarvis P., Selective venous catheterization in Ildrogenism. J. Endocrinol Invest, 14(11): 949-956, 1991.*
4. *Heinonen P.K., Androgen production by epithelial ovarian tumors in postmenopausal women. Maturitas, 13(2): 117-133, 1991.*
5. *Tietz, N.W.: Clinical Guide to Laboratory Tests, Third Edition, pp. 578-580, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1995.*
6. *USA Center of Disease Control national Institute of Health manual "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories", 1984.*

Diagnóstica
Internacional



"Rápida solución a tus necesidades clínicas"

FABRICADO POR:
INTERNATIONAL IMMUNO-DIAGNOSTICS
1155 CHESS DRIVE No. 121
FOSTER CITY, CA 94404 USA