

Inserto Testosterona ELISA

MONOBIND, INC.
TESTOSTERONA
Código de Producto: 3725-300

Intención de uso:

La determinación cuantitativa de la concentración de Testosterona Total en suero humano o plasma por inmunoensayo de enzima en microplato.

RESUMEN Y EXPLICACION DE LA PRUEBA

La Testosterona, (17β-Hydroxy-4-androsterona-3-uno), es el andrógeno secretado naturalmente más potente. En hombres normales en post-pubertad, la testosterona es secretada primariamente por los testículos con solo una pequeña cantidad derivada de la conversión periperar de 4-Androsterona-3, 17-diona (ASD). En mujeres adultas, ha sido estimado que cerca del 50% de la testosterona en suero se deriva de la conversión periperar de ASD secretada por los adrenales y ovarios, tomando en cuenta la secreción directa de testosterona por estas glándulas.

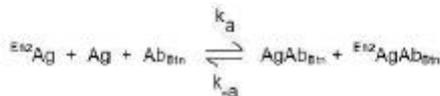
En los hombres, la testosterona esta principalmente sintetizada en las celulas intericiales de Leydig y en los testículos, y está regulada por la hormona estimulante de célula intericial (ICSH), o la hormona Luteinizante (LH) de la pituitaria anterior (equivalente femenino de ICSH). La Testosterona es responsable para del desarrollo de las características sexuales secundarias, tales como los accesorios de los órganos sexuales, la próstata, las vesículas seminales y el crecimiento del vello púbico, facial y axilar. Las mediciones de Testosterona han sido muy útiles en la evaluación de estados hipogonadales. El incremento de los niveles de testosterona en hombres puede ser encontrado en una completa resistencia andrógena (feminización testicular). Las causas comunes del decremento de niveles de testosterona en hombres incluye: hipogonadismo, orquidectomía, terapia de estrógeno, síndrome de Klinefelter, hipopituitarismo y cirrosis hepática.

En las mujeres, los niveles de testosterona son normalmente encontrados a ser menores que aquellos encontrados en hombres sanos. Las Testosterona en las mujeres tiene tres orígenes. Es ta es secretada en pequeñas cantidades tanto por las glándulas adrenales y los ovarios, y en mujeres sanas el 50-60% de la producción de testosterona diaria proviene del metabolismo periferal de la prohormona, primordialmente androstenediona. Las causas comunes de la disminución en los niveles de testosterona en suero en las mujeres incluye ovarios poliquísticos (Síndrome Stein-Leventhal), tumores en ovarios, tumores adrenales e hiperplasia adrenal. La virilización en mujeres está asociada con la administración de andrógenos y endógenos en la sobreproducción de testosterona. Esto parece ser una correlación entre los niveles de testosterona en suero y el decremento de virilización en mujeres, a pesar de que aproximadamente 25% de las mujeres con decrementos variables de virilismo tienen niveles de testosterona en suero que caen dentro de los rangos de referencia femeninos.

PRINCIPIO

Inmunoensayo Competitivo de Enzima (Tipo 7):

Los reactivos esenciales requeridos por un análisis Inmunoenzimométrico incluyen el anticuerpo, conjugado enzima-antígeno y antígeno nativo. Una vez mezclado el anticuerpo biotinilado, conjugado enzima-antígeno y un suero que contienen el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y el conjugado enzima-antígeno para un número limitado de sitios atados de anticuerpo. La interacción es ilustrada por la ecuación seguida:



Ab_{Cw} = Anticuerpo Inmovilizado Monoespecifico (Cantidad Constante)

Ag = Antígeno Nativo (Cantidad Variable)

${}^{E12}Ag$ = Enzima-Antígeno Conjugado (Cantidad Constante)

$AgAb_{B1n}$ = Complejo Antígeno-Anticuerpo

${}^{E12}AgAb_{B1n}$ = Conjugado Enzima-Antígeno-Complejo Anticuerpo

k_a = Valor Constante de Asociación

k_{-a} = Valor Constante de Disociación

$K = k_a / k_{-a}$ = Equilibrio Constante

Una reacción simultánea ocurre entre el biotín adjunto al anticuerpo y el streptavidin inmovilizado en el microplato. Este afecta la separación del anticuerpo atado a la fracción después de la decantación o la aspiración. Esta interacción esta ilustrada abajo:



$Streptavidin_{CW}$ = Streptavidin inmovilizado en pozo

Complejo inmovilizado = Complejo de sandwich atado a la base sólida

La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo-límite es inversamente proporcional a la concentración del antígeno nativo. Utilizando diversas referencias del suero de los valores conocidos del antígeno, una curva de la reacción a cierta dosis puede ser generada de la cual la concentración del antígeno de un desconocido puede ser comprobada.

REACTIVOS

MATERIAL PROVEEIDO

A. Referencias de Suero Humano -1ml/vial - Frascos A-G

Siete (7) frascos de referencia del suero para Testosterona en concentraciones de 0(A), 0.1(B), 0.5(C), 1.0(D), 2.5(E) 5.0(F) y 12.0(G) ng/ml. Almacene a 2-8°C. Se ha agregado un preservativo. Los calibradores pueden ser expresados en concentraciones Molares (nM/L) multiplicando por 3.47.

Por Ejemplo: 1ng/ml x 3.47 = 3.47 nM/L

B. REACTIVO CONJUGADO DE TESTOSTERONA - 7ml/ frasco del icono

Un (1) frasco de testosterona (análogo)-Peroxidasa Horseradish (HRP) conjugada en una matriz de proteína estabilizadora, con tinte azul. Almacene a 2-8°C.

C. BUFFER Conjugado de Testosterona – 7.0 ml/frasco del icono ?

Un (1) frasco de reactivo que contiene buffer, tinte rojo, preservativo y proteínas atadas inhibidoras. Almacene a 2-8°C.

D. REACTIVO Biotin de Testosterona – 6.0ml – frasco del icono ?

Una (1) botella de reactivo que contiene anti-testosterona biotinilada purificada de conejo IgG conjugada en buffer, tinte amarillo y preservativo. Almacénesse a 2-8°C.

E. MICROPLATO REVESTIDO STREPTAVIDIN - 96 pozos - icono ?

Un (1) microplato de 96 pozos cubierto con streptavidin y empaquetado en una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Almacénesse a 2-8°C.

F. SOLUCION CONCENTRADA LAVADORA--20ml - icono

Un (1) frasco que contiene un surfactante en solución salina. Un preservativo ha sido agregado. Almacénesse a 2-8 °C.

G. SUSTRATO A -- 7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene tetrametilbenzidina (TMB) en solución. Almacén en 2-8°C.

H. SUSTRATO B --7ml/frasco icono S

Un (1) frasco que contiene el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en solución. Almacénesse en 2-8°C.

I. SOLUCIÓN DE PARO --8ml/frasco icono

Un (1) frasco que contiene ácido fuerte (1N HCl). Almacénesse en 2-8°C.

J. Instrucciones del producto.

Nota 1: No utilice los reactivos más allá de la fecha de vencimiento del kit.

Nota 2: Los reactivos abiertos son estables por sesenta (60) días cuando están almacenados en 2-8°C.

Nota 3: Los reactivos son para una sola microplaca de 96-pozos.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO PROPORCIONADO:

1. Mida con pipetas capaces de entregar los volúmenes de 10µl, 50µl y 100µl con una precisión de mejor de 1.5%.
2. Dispensadores para las entregas repetidas de los volúmenes 0.100ml y 0.300ml con una precisión de mejor de 1.5%.
3. Dispensadores ajustables para los volúmenes (200-1000µl) para conjugados.
4. Lavador de Micro placas o una botella de apretón (opcional).
5. Lector de Micro placa con filtros de 450nm & 620nm.
6. Papel absorbente para retirar los excesos de los pozos de la micro placa.
7. Plástico envolvente o tapa para la micro placa para los pasos de la incubación.
8. Aspirador de vacío (opcional) para los pasos de lavado.

- Contador de tiempo.
- Materiales del control de calidad

PRECAUCIONES

Para el Uso De Diagnóstico In Vitro No Para el Uso Interno o Externo en Seres Humanos o Animales.

Todos los productos que contienen el suero humano han sido encontrados para ser no-reactivos para el antígeno superficial de la hepatitis B, los anticuerpos del VIH 1&2 y de HCV por los reactivos con licencia del FDA. Puesto que ninguna prueba sabida puede ofrecer termine el aseguramiento que los agentes infecciosos están ausentes, todos los productos humanos del suero deben ser dirigidos como potencialmente peligrosos y capaces de transmitir enfermedad. Los buenos procedimientos del laboratorio para manejar productos de la sangre se pueden encontrar en el Centro para el Control de Enfermedad/el Instituto Nacional de la Salud, "Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos," 2da Edición, 1988, publicación No. (CDC) 88-8395 de HHS.

RECOLECCION DE LA MUESTRA Y PREPARACION

Los especímenes deben ser sangre, suero en tipo y tener las precauciones generales en la colección de muestras del veni-puntura. Para la comparación exacta a los valores normales establecidos, una muestra de ayuno del suero de la mañana debe ser obtenida. La sangre se debe recoger en un tubo liso de venipuntura de tapón rojo sin aditivos o anticoagulantes (para suero) o tubos de evacuación contenidos con EDTA o heparina. Permita que la sangre coagule. Centrifugue el espécimen para separar el suero de las células. Las muestras se pueden refrigerar en 2-8°C por un período máximo de cinco (5) días. Si el espécimen no se puede probar dentro de este tiempo, la muestra se puede almacenar en las temperaturas de -20°C por hasta 30 días. Evite congelar y deshelar. Cuando analice en duplicado, se requiere 0.20ml del espécimen.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS

- REACTIVO DE ENZIMA DE TRABAJO.** – Estable por 1 año. Mida 0.7 ml de "Reactivo de Enzima Testosterona" y añada al frasco que contengan el Buffer Conjugado de Testosterona. Almacénese a 2-8°C.
- SOLUCION LAVADORA.** Diluir el contenido del concentrado lavador a 1000ml con agua destilada o desionizada en un contenedor adecuado. El buffer diluido puede ser almacenado a temperatura ambiente (20-27°C) por no mas de 60 días.
- SOLUCIÓN DE TRABAJO SUSTRATO.** - Estable por 1 año. Vierta el contenido del frasco etiquetado con Solución "A" en el frasco etiquetado con Solución "B". Mezcle y guarde a 2-8°C. Coloque la tapa amarilla sobre el frasco transparente para una fácil identificación. Mezcle y etiquete acordemente. Almacénese a 2-8°C.

Nota: No se use el sustrato de trabajo si este se ve azul.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

Antes de proceder con el análisis, tenga todos los reactivos, referencias del suero y controles a la temperatura ambiente (20 - 27°C.)

- Ajuste a formato los pozos de los micro placas para que cada referencia del suero, control y espécimen del paciente sean analizados en duplicado. **Guarde los micropozos nuevamente dentro del bolso de aluminio, séllela y almacénela en 2-8°C.**
- Mida con una pipeta 0.010 ml (10µl) de la referencia, del control o del espécimen apropiado del suero en el pozo asignado.
- Agregue 0.050 ml (50µl) de la solución del reactivo de la enzima Testosterona a todos los pozos (Vea la Sección de Preparación de Reactivos).
- Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar.
- Agregue 0.050 ml (50µl) del Reactivo Biotin Testosterona a todos los pozos.
- Remolinar el micro placa suavemente por 20-30 segundos para mezclar.
- Cubra e Incube 60 minutos en la temperatura ambiente.
- Deseche el contenido del micro placa por decantación o la aspiración. Si decanta, golpee ligeramente y borre la placa seca con el papel absorbente.
- Agregue 300µl de la solución lavadora (véase la sección de la preparación del reactivo), decántelo (golpee y borre) o aspiré. Repita dos (2) veces adicionales para un total de tres (3) lavadas. **Una lavadora automática o manual de la placa puede ser utilizada. Siga las instrucciones del fabricante para el uso apropiado. Si se emplea una botella de apretón, llene cada a uno bien presionando el envase (evite burbujas de aire) para dispensar la lavada. Decante la lavada y repita dos (2) veces adicionales.**
- Agregue 0.100 ml (100µl) de solución activadora del sustrato a todos los pozos (véase la sección de la preparación del reactivo). **Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo de diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.**

NO AGITE DESPUES DE ADICIONAR EL SUSTRATO

- Incube en la temperatura ambiente por quince (15) minutos.
- Agregue 0.050ml (50µl) de la solución de paro a cada pozo y mezcle suavemente por 15-20 segundos. Agregue siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- Lea la absorbencia en cada pozo en los 450nm (con una longitud de onda de referencia de 620-630nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un lector del micro placa. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregar la solución de paro.

Nota: Diluya las muestras que sospeche sean mayores a una concentración de 12ng/ml 1:5 y 1:10 con el calibrador 0ng/ml o suero de paciente femenino con una valor conocido bajo de testosterona.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe tener controles de ensayo en bajo, medio y alto rango de la curva de la reacción para monitorear el buen funcionamiento del ensayo. Estos controles deben ser tratados como desconocidos y determinar los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben de mantenerse y seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Los métodos estadísticos pertinentes deben ser empleados para comprobar las tendencias. En adición, la máxima absorbancia debe ser consistente con experiencias pasadas. Desviaciones significativas del funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Reactivos frescos deben usarse para determinar la razón de las variaciones.

CALCULO DE RESULTADOS

Una curva en la reacción se usa para comprobar la concentración de Testosterona en especímenes desconocidos.

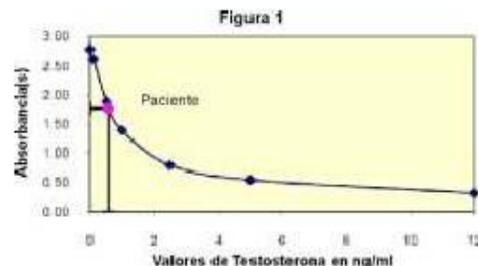
- Registre la absorbencia obtenida del listado del lector del micro placas conforme al ejemplo 1.
- Trace la absorbencia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de Testosterona en ng/ml en el papel de gráfico lineal. (No promedie los duplicados de las referencias del suero antes de dibujar).
- Conecte los puntos y dibuje la mejor curva a través de los puntos trazados.
- Para determinar la concentración de Testosterona para un desconocido, localice la absorbencia media de los duplicados para cada desconocido en el eje del gráfico, encuentre el punto que se intersecta en la curva, y lea la concentración (en ng/ml) del eje horizontal del gráfico (los duplicados del desconocido se pueden hacer un promedio según lo indicado). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia (1.764) intersecta la curva de respuesta a la dosis en (0.57ng/ml) la concentración de Testosterona. (vea la figura 1).

Nota: El software de la reducción de datos de la computadora diseñado para los análisis de ELISA se puede también utilizar para la reducción de datos.

EJEMPLO 1

Muestra	I.D.	Pozo	Abs (A)	Signif. Abs (B)	Valor (ng/ml)
Cal A		A1	2.780	2.787	0
		B1	2.794		
Cal B		C1	2.576	2.611	0.1
		D1	2.646		
Cal C		E1	1.789	1.877	0.5
		F1	1.955		
Cal D		G1	1.391	1.392	1.0
		H1	1.393		
Cal E		A2	0.780	0.788	2.5
		B2	0.796		
Cal F		C2	0.530	0.538	5.0
		D2	0.547		
Cal G		E2	0.331	0.308	12.0
		F2	0.314		
Ctrl 1		G2	1.040	0.760	1.61
		H2	1.045		
Patient		A3	1.751	1.764	0.57
		B3	1.778		

* Las informaciones presentadas en el Ejemplo 1 y figura 1 son ilustrativas solamente no deben usarse para basarse en la curva preparada con cada ensayo.



PARAMETROS DEL CONTROL DE CALIDAD

En orden para que los resultados del análisis sean considerados válidos los criterios siguientes deben ser conocidos:

- La absorbencia (OD) del calibrador 0 ng/ml debe ser ? 1.3.
- Cuatro fuera de seis piscinas de control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

A. Funcionamiento

1. Es importante que el tiempo de la reacción en cada uno pozos este llevada a cabo constante para que los resultados se produzcan. El medir con una pipeta de muestras no debe extender más allá de diez (10) minutos para evitar la deriva del análisis.
2. Si se utiliza más de una (1) placa, se recomienda repetir la curva de la reacción a cierta dosis.
3. La adición de la solución del sustrato inicia una reacción cinética, que es terminada por la adición de la solución de paro. Por lo tanto, la adición del sustrato y de la solución de paro se agrega en la misma secuencia para eliminar cualquier desviación de tiempo durante la reacción.
4. Los lectores de la placa miden verticalmente. No toque el fondo de los pozos.
5. La falta de retirar la solución adecuadamente en el paso del lavado y de la aspiración o de la decantación puede dar lugar a la réplica pobre y a resultados falsos.
6. Utilice los componentes del mismo lote. No entre mezclas e los reactivos de diferentes lotes.

B. Interpretación

1. Si la reducción de datos controlados de la computadora se utilizan para interpretar los resultados de la prueba, es imperativo que los valores predichos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.

RANGOS ESPERADOS Y VALORES

En concordancia con los intervalos de referencia establecidos para una población adulta "normal" los rangos esperados para el Sistema de Pruebas para Testosterona AccuBind™ son detallados en la Tabla 1.

TABLA I
Valores Esperados para la prueba de TESTOSTERONA por ELISA
(En ng/ml)

Hombres	2.5 - - 10.0
Mujeres	0.2 - - 0.95

Es importante tener presente que el establecimiento de una gama de los valores que se pueden esperar se encontrado por un método dado para una población de "personas-normal" es dependiente sobre una multiplicidad de factores: la especificidad del método, de la población probada y de la precisión del método en las manos del analista. Por estas razones cada laboratorio debe depender de la gama de valores establecidos esperados por el fabricante solamente hasta que una lata interna de la gama determinada por los analistas usando el método con una población indígena al área en la cual el laboratorio está situado.

CARACTERISTICAS DE ACTUACION

A. Precisión

La precisión en y entre la precisión del análisis del procedimiento de Testosterona por ELISA en Micro placa fue determinada por análisis en tres diversos niveles de los sueros del control. El número, el valor medio, la desviación de estándar y el coeficiente de variación para cada uno de estos sueros del control se presentan en la tabla 2 y la tabla 3.

PRECISIÓN DENTRO DE ANÁLISIS (VALORES EN NG/ML)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	22	1.61	0.07	4.5%
Normal	22	4.86	0.25	5.2%
Alto	22	8.19	0.59	7.3%

PRECISIÓN ENTRE ANÁLISIS* (VALORES EN NG/ML)

Muestra	N	X	σ	C.V.
Bajo	10	1.47	0.09	6.3%
Normal	10	4.90	0.29	5.9%
Alto	10	8.99	0.54	6.0%

* Según lo medido en diez experimentos en duplicado

B. Exactitud

El procedimiento de Testosterona por micro plato de ELISA fue comparado con un método de referencia de quimioluminiscencia. Fueron usados especímenes biológicos de poblaciones en niveles desde bajo, normal y alto de testosterona. (Los valores de rango desde 0.29ng/ml – 21.9ng/ml). El número total de estos especímenes fue de 58. La ecuación de regresión del último cuadro y la correlación del coeficiente fueron computadas para la Testosterona por ELISA en comparación con el método de referencia. La información obtenida se muestra en la tabla 4.

TABLA 4
Ultimo Cuadro
Regresión

Método	Signif (X)Análisis	Regresión	Correlación Coeficiente
Este método (Y)	3.12	y=0.265 + 0.944(X)	0.985
Referencia (X)	3.02		

Solo una pequeña cantidad de la referencia de diagonal entre este método y el método de referencia es indicada por la proximidad de los valores medios. La ecuación de la regresión de la última tabla y el coeficiente de correlación indica un acuerdo excelente del método.

C. Sensibilidad

El Sistema de Pruebas en Microplato de Testosterona AccuBind™ tiene una sensibilidad de 0.38pg. Este es el equivalente a una muestra que contiene una concentración de 0.038ng/ml. La sensibilidad fue comprobada determinando la variabilidad de calibrador de suero 0ng/ml y usando el 2° (95% certeza) de estadística para calcular la dosis mínima.

D. Especificidad:

El % de reactividad cruzada del anticuerpo de Testosterona para seleccionar sustancias fue evaluada agregando la sustancia que interfería a una matriz del suero en las varias concentraciones. La reactividad cruzada fue calculada derivando un cociente entre la dosis de la sustancia que interfería a la dosis de testosterona necesaria para desplazar el mismo trazo de la absorbancia.

Sustancia	Reactividad Cruzada
Testosterona	1.0000
Androstenediona	0.0009
Dihidrottestosterona	0.0178
Cortisona	< 0.0001
Corticosterona	< 0.0001
Cortisol	< 0.0001
Espiro lactona	< 0.0001
Progesterona	< 0.0001
17?-OH Progesterona	< 0.0001
DHEA Sulfato	< 0.0001
Estradiol	< 0.0001
Estrona	< 0.0001
Estrinol	< 0.0001

REFERENCIA

1. Dorfman, RI and Shipley, RA, ED: Androgens, New York, John Wiley and Sons, 1956.
2. Faiman C and Winter, JSD, Reyes, FI, Clin Obstet Gynaecol, 3, 467 (1976).
3. Sizonenka, PC, *Pediatrician*, 14, 191 (1987).
4. Lashansky, G, et. al., *J Clin Endocrinol Metab*, 58, 674 (1991)
5. Tietz, NW, ED: Clinical Guide to Laboratory Tests, 3rd ed. Philadelphia, WA Saunders Co, 1995.

