

Testosterona [I-125] RIA KIT

RK-61CT. Estuche para 100 determinaciones

Juego de reactivos para la determinación cuantitativa *in vitro* de Testosterona en suero humano, en el rango de 0-60 nmol/L (0-17.4 ng/mL).

Introducción

La Testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona) es el andrógeno natural más potente. En los hombres es segregada fundamentalmente en los testículos y en las mujeres en las glándulas suprarrenales y ovarios. En varones, su concentración sérica durante la infancia es baja y comienza a aumentar con la pubertad. Aproximadamente un 60% de la Testosterona sérica se encuentra ligada a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) con gran afinidad.

En condiciones normales, la Testosterona estimula la espermatogénesis y el desarrollo de los genitales masculinos externos. En hombres, se observan concentraciones elevadas en casos de pubertad precoz, deficiencia congénita de la 21-hidroxilasa, hiperplasia adrenal (síndrome de Cushing) y tumores testiculares. En mujeres la Testosterona puede elevarse en casos de tumores de ovario y endometrio, en el síndrome Stein-Leventhal (ovario poliquístico), en la hiperplasia adrenal, el hirsutismo y la terapia glucocorticoide.

Los niveles disminuidos de Testosterona en varones pueden observarse en el hipogonadismo primario o secundario, el anorquismo, agonadismo, el síndrome de Klinerfelter, el síndrome de Kallman y en la cirrosis hepática. En las mujeres disminuye su concentración en la post-menopausia.

Principio del ensayo

Este ensayo está basado en una reacción competitiva entre la Testosterona no marcada, presente en las muestras y calibradores, con una cantidad fija de Testosterona marcada con ¹²⁵I por un número limitado de sitios de unión al anticuerpo anti-Testosterona. La cantidad de Testosterona marcada con ¹²⁵I que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de Testosterona no marcada presente en las muestras.

El inmuno-complejo se inmoviliza en la superficie reactiva de los tubos de ensayo durante un período de incubación de 2 horas bajo agitación constante. Después de la incubación se decantan y lavan los tubos y se mide la radiactividad enlazada en un contador gamma.

La concentración del antígeno es inversamente proporcional a la radiactividad medida en los tubos. Utilizando los calibradores de concentración conocida de Testosterona, se prepara una curva estándar a partir de la cual se determina por interpolación la concentración de Testosterona presente en las muestras.

Contenido del juego

1. TRAZADOR, 1 frasco con 44 mL, listo para usar, contiene < 260 kBq de Testosterona marcada con ¹²⁵I en solución tampón con 0,1 % NaN₃.
2. CALIBRADORES (S1-S6), 6 frascos listos para usar con 0,5 mL de suero humano y 0,1% NaN₃. Los calibradores contienen: 0 – 0,6 – 2 – 6 – 20 – 60 nmol/L de Testosterona.
3. SUERO CONTROL, 2 frascos, listos para usar, contienen 0,5 mL de suero humano con 0,1% NaN₃. La concentración de los controles está especificada en el certificado de calidad incluido.
4. TUBOS RECUBIERTOS: 2x50 tubos de 12x75 mm, recubiertos con anticuerpo monoclonal anti-Testosterona, empaquetados en cajas plásticas, listos para usar.

Materiales y equipos necesarios

Gradilla para tubos de ensayo, pipeta de precisión con puntas desechables (25 μ L), agitador horizontal u orbital, lámina de polietileno, papel absorbente, contador gamma, agua destilada.

Materiales y equipos recomendados:

Pipeta de repetición (400 μ L). Jeringa automática (dispensador) o pipeta de repetición (2 mL) para el lavado.

Recolección y almacenamiento de las muestras

Las muestras de suero deben colectarse de acuerdo a los procedimientos habituales que se practican en los laboratorios clínicos. Las muestras pueden conservarse entre 2 y 8 $^{\circ}$ C si el análisis se efectuará dentro de las 24 horas siguientes a su recolección, de lo contrario deben conservarse congeladas a una temperatura igual o menor que -20 $^{\circ}$ C. Las muestras congeladas deben descongelarse y mezclarse completamente antes de su uso. Evitar la congelación y descongelación repetida de las muestras.

PRECAUCIÓN!

Permitir que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (mín. 1 hora). Homogenizar completamente los reactivos y muestras antes de su uso, evitando la formación de espuma.

Procedimiento para el ensayo

(Ver Tabla 1.)

1. Rotular los tubos recubiertos por duplicado para cada calibrador (S1-S6), suero control (CI-CII) y muestras (M). Opcionalmente, marcar dos tubos no recubiertos para los totales (T).
2. Añadir por duplicado 25 μ L de calibrador, suero control y muestras en los tubos apropiados.
3. Añadir 400 μ L de trazador en cada tubo.
4. Fijar la gradilla con los tubos de ensayo firmemente en el agitador. Cubrir los tubos con una lámina de polietileno. Encender el agitador y ajustar la velocidad de manera tal que el líquido en los tubos esté rotando o agitándose constantemente.

5. Incubar los tubos en el agitador durante 2 horas a temperatura ambiente (20 - 25 $^{\circ}$ C).
6. Aspirar o decantar el líquido de todos los tubos (excepto T) mediante la inversión de la gradilla. Colocar la gradilla sobre un papel absorbente por 2 minutos manteniendo la posición invertida.
7. Añadir 2 mL de agua destilada a cada tubo. Repetir el paso 6.
8. Medir la radiactividad de cada tubo por 60 segundos en un contador gamma y calcular la concentración de Testosterona en las muestras como se describe a continuación.

Atención: Las temperaturas de incubación elevadas pueden ocasionar resultados falsos, es importante mantener el rango de temperatura recomendado durante la incubación.

Tabla 1. Protocolo del ensayo (*volúmenes en microlitros*)

	T	S1-S6	CI-CII	Mx
Calibrador		25		
Control			25	
Muestras				25
Trazador	400	400	400	400
Agitar 2 horas a temperatura ambiente (20-25 $^{\circ}$ C)				
Decantar y secar en papel absorbente				
Agua destilada		2000	2000	2000
Decantar y secar en papel absorbente				
Medir la radiactividad (60 s/tubo)				
Calcular los resultados				

Cálculo de los resultados

En la Tabla 2 y la figura 1 se muestran a manera de ejemplo los cálculos y una curva estándar típica de un ensayo.

Para los cálculos:

Hallar la media de los conteos por minuto (cpm) para cada par de tubos.

Calcular el porcentaje $B_0/T\%$ para el calibrador de concentración cero (S1) según la ecuación siguiente:

$$B_0/T\% = \frac{S1 \text{ (cpm)}}{T \text{ (cpm)}} \times 100$$

Calcular el porcentaje de unión para cada calibrador, control y muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$B/B_0(\%) = \frac{S2-6 / CI-CII / Mx \text{ (cpm)}}{S1 \text{ (cpm)}} \times 100$$

Plotear los porcentajes B/B_0 (%) contra la concentración de Testosterona de cada calibrador en un papel semi-logarítmico. Determinar la concentración de Testosterona en las muestras por interpolación de la curva estándar. No extrapolar valores fuera del rango de la curva.

Para el procesamiento automatizado de los datos pueden utilizarse programas de ajuste tipo spline o logit-log.

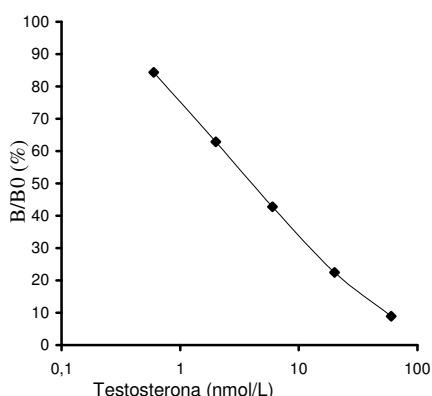
Tabla 2. Datos típicos del ensayo

Tubos	CPM1	CPM2	Media CPM	Bo/T %	B/Bo %
T	81805	81299	81552		
S1	33103	32440	32772	40.2	
S2	28228	27079	27654		84.4
S3	21193	20005	20599		62.9
S4	13432	14645	14039		42.8
S5	7413	7334	7374		22.5
S6	2853	2940	2897		8.8
CI	23129	22780	22955		70.0
CII	9044	8967	9006		27.5

Figura 1.

Ejemplo de curva estándar

(No utilizar para calcular valores de las muestras!)



Características del ensayo

Sensibilidad

La sensibilidad analítica es de 0,12 nmol/L, calculada como la concentración correspondiente al valor de enlace medio más dos desviaciones estándar para 20 réplicas del calibrador de concentración cero.

En base a 120 determinaciones (60 de calibrador cero y 60 de muestras con baja concentración) y con un 95% de probabilidad, los límites de medición son:

Límite del Blanco (LoB): 0,075 nmol/L

Límite de Detección (LoD): 0,14 nmol/L

Sensibilidad funcional = Límite de Cuantificación (LoQ): 0,21 nmol/L

Especificidad

Se adicionaron diferentes esteroides al calibrador de concentración cero en dos concentraciones: 70 nM y 700 nM y se determinó la concentración aparente de Testosterona.

Concentración añadida:	70 nM	700 nM
Testosterona aparente medida (nM)		
Estriol	0,1	0,31
11-Deoxicortisol	0,04	0,66
Androstandiol	0,1	0,73
Androstendiol	0	1,03
Cortisol	0,2	1,55
17-β-Estradiol	0,17	1,58
5-β-dihidro-testosterona	0,39	8,52
5-α-dihidro-testosterona	0,83	12,66
Androstendiona	1	15,9
Noretisterona	1,34	16,79

Con los siguientes esteroides adicionados a 700 nM se obtuvo un resultado no detectable: 17-α-OH-Progesterona, DHEA, Progesterona, Aldosterona, Estrona, Cortisona, Prednisolona, Dexametasona, Pregnenolona, Sulfato de Pregnenolona, Corticosterona, Deoxicorticosterona, acetato de Noretisterona. La reactividad cruzada con DHEA-S se evaluó a 30 μmol/L, la concentración aparente de Testosterona medida fue 0,43 nmol/L.

Precisión

La precisión intra-ensayo se determinó a partir de 20 réplicas de 5 muestras, medidas en una serie. Para determinar la precisión inter-ensayo se midieron por duplicado 5 muestras, en 20 series independientes. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Intra-assay		Inter-assay	
Media (nmol/L)	CV%	Media (nmol/L)	CV%
0,99	7,3	0,98	12,0
2,17	8,9	2,20	10,8
6,76	7,2	6,52	8,3
12,87	3,0	13,02	7,1
33,54	2,8	34,94	6,4

Prueba de dilución (linealidad)

Se diluyeron serialmente 4 muestras con suero humano de baja concentración y se sometieron a ensayo. La recuperación media después de la dilución fue de 81,8%. Se obtuvo la siguiente relación lineal entre los valores medidos (Y) y los valores esperados (X):

$$Y = 0,9496X - 0,8119 \quad R^2 = 0,9961 \quad n = 12$$

Prueba de Recuperación

La recuperación se determinó como la diferencia porcentual entre el incremento observado y el incremento esperado, luego de añadir tres concentraciones conocidas de Testosterona a cinco muestras de concentraciones endógenas diferentes.

La recuperación media obtenida fue 92,7% con un rango de 81,8% a 103,3%.

Valores de referencia

Los valores presentados a continuación deben considerarse como informativos. Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios intervalos de referencia.

Hombres: 5,6 - 30,8 nmol/L (2,5% - 97,5%)
media ± SD: 15,14 ± 5,7 nmol/L
mediana: 15,12 nmol/L

Mujeres: 0,3 - 3,8 nmol/L (2,5% - 97,5%)
media ± SD: 1,47 ± 0,66 nmol/L
mediana: 1,49 nmol/L

Conversión de las unidades de medida

1 nmol/L = 0,29 ng/mL

1 ng/mL = 3,47 nmol/L

Notas acerca del procedimiento

1) **Fuente de error!** Los tubos recubiertos no están marcados individualmente. Se debe evitar la mezcla con tubos de ensayo comunes. Para minimizar este riesgo, no se deben sacar de la caja más tubos de los necesarios, de igual manera los tubos no utilizados en una serie deben ser guardados de nuevo en su caja. Se recomienda rotular los tubos con marcador permanente.

2) **Fuente de error!** Para asegurar la agitación eficiente de los tubos se debe utilizar una gradilla que los ajuste firmemente. Una agitación inadecuada puede provocar un rendimiento deficiente del ensayo y falsos resultados.

Atención! No mezclar los componentes de lotes diferentes o con productos de otro fabricante!

Precauciones

Material radiactivo

Este producto contiene material radiactivo. Es responsabilidad de cada laboratorio cumplir con las regulaciones locales referentes a la manipulación, conservación y desecho de materiales radiactivos.

Material potencialmente infeccioso

El suero humano utilizado en este producto ha sido analizado con métodos aprobados y no ha presentado positividad para anticuerpos frente a los virus de Inmunodeficiencia Humana (Anti-HIV-1/2) y Hepatitis-C (HCV), anticuerpos anti-Treponema y el antígeno de superficie de la Hepatitis-B (HBsAg). Ninguno de los métodos analíticos disponibles actualmente puede garantizar por completo la eliminación de posibles riesgos biológicos. Se deben manipular todos los reactivos y muestras de sangre como *material potencialmente infeccioso*.

Peligro químico

Algunos componentes de este juego contienen azida sódica como preservante. Al verter los desechos no radiactivos al sistema de desagüe se debe diluir con grandes cantidades de agua, para evitar la acumulación de azidas metálicas explosivas en las tuberías de plomo y cobre. Este producto contiene en total 48 mg de azida sódica.

	Fecha de vencimiento	LOT	Número de lote
	Almacenar entre 2 y 8 °C	CONTROL	Suero Control
	Precaución	CAL	Calibrador
	Peligro biológico	CT	Tubos recubiertos
	Consulte las instrucciones	TRAC	Trazador
	Dispositivo para diagnóstico <i>in vitro</i>	REF	Número de referencia
	Fabricante		Material radiactivo



Sitio WEB: <http://www.izotop.hu>

E-mail técnico: immuno@izotop.hu

E-mail comercial: commerce@izotop.hu

IZOTOP

INSTITUTE OF ISOTOPES Ltd.

1535 Budapest. Pf.: 851.

Tel.: (+36) 1-392-2577, Fax: (+36) 1-395-9247

Edición: Diciembre/2017