

Instrucciones de Uso

Free Testosterone ELISA

Immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Testosterona Libre en suero humano.

REF **DB52181**

 **96**

   **2°C** **8°C**

EU: **IVD**  **2797**



IBL International GmbH
Flughafenstrasse 52a
22335 Hamburg, Germany

Always there for you



HISTORIAL DE REVISIÓN DE LA INSTRUCCIONES DE USO**Cambios desde la versión anterior 2021-12 a la versión actual 2022-11**

Portada	Cambio de disposición
Capítulo 2	Capítulo adicional: EL PROPÓSITO PREVISTO
Capítulo 3	Actualización de la validez científica
Capítulo 5	Información adicional
Capítulo 6	Actualización / Información adicional
Capítulo 7	Actualización / Información adicional
Capítulo 8	Actualización / Información adicional
Capítulo 15	Actualización
Capítulo 16	Actualización / Información adicional
Capítulo 17	Actualización
Capítulo 18	Actualización (Trazabilidad Metrológica)
Capítulo 19	Actualización de la literatura

1. USO PREVISTO

Immunoensayo enzimático para la determinación cuantitativa de Testosterona Libre en suero humano.

2. EL PROPÓSITO PREVISTO

El Free Testosterone ELISA está destinado a la medición de testosterona libre en suero en adultos. La medición de la testosterona libre es una ayuda en el diagnóstico del desequilibrio hormonal que resulta en varias condiciones clínicas como el hipogonadismo (deficiencia de andrógenos) en los hombres y el hiperandrogenismo (exceso de hormonas andrógenas), por ejemplo, ovarios poliquísticos en las mujeres.

El Free Testosterone ELISA es un ensayo inmunoenzimático (ELISA) en fase sólida, basado en el principio de unión competitiva y medido en un lector de absorbancia. El ensayo es semiautomatizado y requiere instrumentos de laboratorio de uso general y consumibles como lector/lavador de microplacas de absorbancia, vortexer y pipetas para ejecutar la prueba. El ensayo es adaptable por el personal de laboratorio para automatizarlo en plataformas de manipulación de líquidos abiertas basadas en ELISA como EVOlyzer o DSX; sin embargo, la programación de los pasos y el tiempo requeridos por las instrucciones de ensayo del kit manual deben ser estrictamente respetados y verificados por el laboratorio. Los resultados de la prueba pueden calcularse a partir de una curva estándar y compararse con rangos de referencia establecidos por el laboratorio a partir de adultos sanos (es decir, rangos normales). El kit de pruebas está destinado al uso profesional en laboratorios por parte de personal capacitado. El ensayo no es para uso doméstico o no profesional. La prueba Free Testosterone ELISA NO está destinado a los puntos de atención.

3. IMPLICACIONES CLÍNICAS

La testosterona es una hormona pleiotrópica ^[1], lo que significa que afecta a diferentes fenotipos y desempeña un papel importante en el cuerpo humano. Es un esteroide C19 y la hormona natural más eficaz de la familia de los andrógenos.

En los hombres, la testosterona es producida por los testículos y, en menor medida, por la corteza suprarrenal. En las mujeres, la testosterona se produce en la corteza suprarrenal y los ovarios, lo que representa el 50 % de la testosterona, mientras que el resto se produce a partir de tejidos periféricos como los huesos, las mamas, los músculos y la grasa.^[2]

Al igual que otras hormonas esteroideas, las concentraciones de testosterona siguen un ritmo diurno, con niveles máximos de testosterona por la mañana y un descenso durante el día.^[3]

Aproximadamente entre el 1 y el 5 % de testosterona libre está presente en el suero de individuos sanos, con un 38 % de testosterona ligada a la albúmina y un 60 % de testosterona ligada a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG); estas dos últimas normalmente no pueden entrar en el entorno intracelular y ejercer sus efectos bioquímicos.^[4: 5]

Para determinar el nivel de testosterona, es relevante medir la fracción libre ^[7] porque es biológicamente activa ^[6] y puede realizarse en fluidos corporales como el plasma o el suero.

La medición de la testosterona desempeña un papel fundamental en el diagnóstico de diferentes trastornos endocrinos. ^[1] Un aumento del nivel de testosterona puede deberse a anomalías testiculares o hipofisarias ^[7] o al abuso de andrógenos en los hombres.

Puede observarse una disminución de la producción hormonal, incluida la testosterona, en hombres que envejecen y que experimentan diversos síntomas con la disminución de los niveles de testosterona, por ejemplo, adelgazamiento del cabello, pérdida de vigor o disfunción sexual.^[8] La medición en mujeres se aplica como ayuda para diagnosticar hipogonadismo clínico y para ayudar a diagnosticar estados hiperandrogénicos, por ejemplo, hirsutismo, insuficiencia ovárica ^[9] e hiperplasia suprarrenal congénita infantil ^[10], neoplasia ovárica o suprarrenal, síndrome de ovario poliquístico.^[11; 12]

4. PRINCIPIO DEL ENSAYO

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) está basado en el principio de la competencia. Una cantidad desconocida de antígeno presente en la muestra y una cantidad fija de antígeno marcado enzimáticamente compiten por los sitios de unión de los anticuerpos que recubren los pozos. Tras la reacción del sustrato los pozos se lavan para detener la reacción de competencia. Después de la reacción del sustrato la intensidad del color desarrollado es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno de la muestra. Los resultados de las muestras se pueden determinar directamente usando la curva estándar.

5. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Sólo para uso en *diagnóstico in-vitro*. Sólo para uso profesional.
2. Antes de comenzar el ensayo lea las instrucciones completa y cuidadosamente. Use la versión válida del prospecto que se ofrece con el juego de reactivos. Asegúrese de entenderlo todo.
3. En caso de daño severo del estuche del juego de reactivos, contacte por favor a IBL o a su suministrador en forma escrita antes de transcurrida una semana de la recepción. No utilice los componentes dañados en los ensayos pero guárdelos en forma segura para el reclamo.
4. El vidrio roto puede causar lesiones. Maneje los recipientes de cristal con precaución.
5. Tome en cuenta el número de lote y la fecha de caducidad. No mezcle reactivos de diferentes lotes. No use reactivos vencidos.
6. Cumpla con las buenas prácticas de laboratorio y las pautas de seguridad. Use bata de laboratorio, guantes de látex desechables y gafas de protección cuando sea necesario.
7. Los reactivos de este juego que contienen materiales peligrosos pueden causar irritación ocular y cutánea. Vea MATERIAL SUMINISTRADO y las etiquetas para los detalles. Las Hojas de Datos de Seguridad de los materiales para este producto están disponibles en la página de internet de IBL o mediante solicitud directa a IBL.
8. Los reactivos químicos y los reactivos preparados, usados, no usados o expirados deben ser tratados como desechos peligrosos de acuerdo con las regulaciones nacionales sobre bioseguridad y pautas de seguridad.
9. El personal de limpieza debe ser capacitado por profesionales para el manejo de residuos peligrosos.
10. Todos los incidentes graves relacionados con este producto serán notificados al fabricante y a la autoridad competente del Estado miembro en el que esté establecido el usuario y/o el paciente.
11. Algunos reactivos contienen azida de sodio (NaN_3) como preservativo. En caso de contacto con los ojos o la piel, lávese inmediatamente con agua. La NaN_3 puede reaccionar con el plomo o el cobre de las cañerías formando azidas metálicas explosivas. Cuando elimine los reactivos y para evitar acumulaciones, lave con gran cantidad de agua.
12. El producto contiene material de origen animal, certificado como aparentemente libre de enfermedades infecciosas o contagiosas y parásitos dañinos. En cualquier caso, el material debe ser manipulado con extrema precaución.
13. Todos los reactivos de este juego que contienen suero o plasma humano han sido ensayados y encontrados negativos para anti-HIV I/II, HBsAg and anti-HCV. Sin embargo, la presencia de estos u otros agentes infecciosos no puede ser excluida en forma absoluta, por lo que estos reactivos deben ser tratados como peligros biológicos potenciales a los efectos de su manipulación y eliminación.
14. Evite el contacto con la Solución de Parada. Puede causar irritaciones y quemaduras en la piel.

6. ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

El juego de reactivos es enviado a temperatura ambiente y debe ser almacenado a 2 - 8°C. Manteniéndose alejado del calor o de la luz solar directa. El almacenamiento y estabilidad de muestras y reactivos preparados se detalla en los capítulos correspondientes.

Los reactivos no abiertos son estables hasta la fecha de caducidad indicada. El juego de reactivos es estable hasta 6 meses después de la primera abertura (sin exceder la fecha de caducidad) si se almacena la placa de microtitulación herméticamente cerrada en un bolso y los viales cerrados con sus tapas (de cierre) a la temperatura indicada.

7. TOMA Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Toma de la muestra

Se deben observar las precauciones usuales para la venipuntura. Es importante preservar la integridad química de la muestra de sangre desde el momento de su toma hasta el ensayo. No emplee muestras fuertemente hemolizadas, lipémicas o ictericas. Es posible utilizar NaN_3 , ProClin 300 o timerosal como conservante. Las muestras que presenten turbidez deben centrifugarse antes del ensayo para eliminar cualquier material particulado.

Contenedor para la toma de muestras

No hay requisitos especiales.

Almacenamiento de muestras

- Almacenamiento: -20°C (Alícuotas) / Estabilidad: ≤ 6 meses
- Almacenamiento: $2 - 8^\circ\text{C}$ / Estabilidad: 7 días

Para su embarque las muestras deben congelarse. Manténgase alejado del calor o de la luz solar directa.

Se recomienda limitar el número de ciclos de congelación/descongelación a un máximo de 5.

Las muestras congeladas deberían alcanzar la temperatura ambiente lentamente y deberían ser mezcladas antes de pipetearlas. No descongele las muestras en un baño María a 37°C .

8. MATERIALES SUMINISTRADOS

Cantidad	Símbolo	Origen	Componente
1 x 12x8			Placa de Microtitulación Tiras separables. MTP (12 tiras de 8 pozos cada una) Recubierto con anticuerpo de ratón anti-testosterona (monoclonal). Secado al vacío.
1 x 15 mL			Conjugado Enzimático Listo para usar. Contenido: Testosterona conjugada con HRP y $< 0.1\%$ metilisotiazolinona (p/p)
1 x 6 x 1.0 mL			Estándar A-F Listo para usar. 0; 0.25; 2.5; 10; 25; 100 pg/mL. Contenido: Testosterona, Suero humano y $< 0.1\%$ ProClin300 (p/p)
1 x 2 x 1.0 mL			Control 1+2 Listo para usar. Contenido: Testosterona, Suero humano, y $< 0.1\%$ ProClin300 (p/p)
1 x 15 mL			Solución de Substrato TMB Listo para usar. Contiene 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina solución.
1 x 15 mL			Solución de Parada TMB Listo para usar. Contiene ácido sulfúrico 1 M
1 x 100 mL	 		Solución Buffer de Lavado Concentrado (10x) Tampón fosfatada con $\leq 1\%$ Tween 20 (p/p).

9. MATERIALES REQUERIDOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Micropipetas (Multipette Eppendorf o dispositivos similares, $< 3\%$ CV). Volúmenes: 25; 50; 100; 150 y 250 μL
2. Vortex
3. Micropipeta multicanal de 8 canales con reservorio de reactivo
4. Frasco lavador, sistema automatizado o semi-automatizado de lavado de placas de microtitulación
5. Incubadora, 37°C
6. Fotómetro para placas de microtitulación capaz de leer absorbancias a 450 nm (longitud de onda de referencia 600 - 650 nm)
7. Agua bidestilada o desionizada
8. Toallas de papel, puntas para las micropipetas y cronómetro

10. INDICACIONES PARA EL PROCEDIMIENTO

1. Cualquier manipulación inadecuada de las muestras o modificación del procedimiento de ensayo puede alterar los resultados. Los volúmenes a pipetear, los tiempos de incubación, las temperaturas y etapas de pretratamientos tienen que ser efectuados estrictamente siguiendo las instrucciones. Use sólo pipetas u otros dispositivos calibrados.
2. Una vez comenzado el ensayo, se deben completar todas las etapas sin interrupción. Asegúrese de que los reactivos, materiales y dispositivos necesarios estén listos en el momento adecuado. Permita que todos los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente (18 - 25°C) y agite suavemente por rotación cada vial de reactivo líquido o muestra antes del uso. Evite la formación de espuma.
3. Evite la contaminación de los reactivos, pipetas pocillos y/o tubos. Emplee una punta desechable nueva para cada reactivo, estándar o muestra. No intercambie las tapas. Tape siempre los viales que no estén en uso. No reutilice los pocillos, tubos o reactivos.
4. Se recomienda ensayar por duplicado para poder identificar errores potenciales de pipeteo.
5. Use un esquema de pipeteo apropiado según las dimensiones de la placa.
6. El tiempo de incubación afecta los resultados. Todos los pocillos deben ser manipulados en el mismo orden y secuencia de tiempo. Para el pipeteo de soluciones en los pocillos se recomienda una pipeta de 8 canales.
7. El lavado de la placa de microtitulación es un paso importante. Los pocillos insuficientemente lavados conllevan a resultados erróneos. Se recomienda emplear una pipeta multicanal o un sistema automático de lavado. No deje secar los pocillos entre incubaciones. Cuide de no dañar el recubrimiento de las placas durante el enjuague y/o la aspiración. Enjuague y agregue los reactivos cuidadosamente. Al enjuagar cerciórese que todos los pocillos estén completamente llenos con la Solución Buffer de Lavado y que no haya residuos en ellos.
8. La humedad afecta los pocillos y tubos recubiertos. No abra la bolsa hasta que alcance la temperatura ambiente. Los pocillos o tubos que no se empleen deben guardarse inmediatamente en la bolsa resellada con desecante.

11. INSTRUCCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL ENSAYO

El contenido de los 96 determinaciones del kit, puede ser dividido en 3 ensayos separados.

Los volúmenes indicados a continuación corresponden a un ensayo de todas tiras (96 determinaciones).

11.1. Preparación de componentes concentrados

Diluya / disuelva	Componente	con	Diluyente	Relación	Notas	Almacenamiento	Estabilidad
100 mL	WASHBUF CONC	900 mL	agua bidest.	1:10	Mezcle vigorosamente	2 - 8°C	hasta 8 semanas

11.2. Dilución de Muestras

Pretratamiento de la muestra: ninguna.

Las muestras superior a 100 pg/mL no se debe diluir. Dilución puede alterar el equilibrio entre la testosterona libre y las proteínas del suero.

12. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

1.	Pipetee 25 µL de cada Estándar , Control y muestra en los pozos respectivos de la placa de microtitulación.
2.	Pipetee 100 µL de Conjugado de Enzima en cada pozo.
3.	Mezcle bien para 10 segundos.
4.	Incube 1 hora a 37°C. No Cubra la placa.
5.	Lave la placa 3x con 250 µL de Solución Buffer de Lavado . Remueva totalmente el exceso de la solución, golpeando cuidadosamente la placa invertida sobre una toalla de papel.
6.	Pipetee 100 µL de Solución de Substrato TMB en cada pocillo.
7.	Incube 15 minutos a 18 - 25°C (temperatura ambiente).
8.	Detenga la reacción del sustrato, añadiendo 100 µL de Solución de Parada TMB en cada pocillo. Agite brevemente. El color cambia de azul a amarillo.
9.	Mida la densidad óptica con un fotómetro 450 nm (Longitud de onda de referencia: 600 - 650 nm) antes de 15 minutos después de añadir la Solución de Parada.

13. AUTOMATIZACIÓN

Se pueden proporcionar protocolos automatizados para los sistemas ELISA abiertos, p.e.: DSX ELISA Processor, BEP2000 ELISA Processor o EVOlyzer.

Para obtener más información, póngase en contacto con: ProductSupport.IBL@tecan.com

Para el uso de productos en instrumentos automatizados es absolutamente necesario realizar y mantener una validación de acuerdo con los requisitos legales. Una validación exitosa del proceso es un prerrequisito para el uso con fines de diagnóstico. La responsabilidad de la implementación y documentación de la validación de acuerdo con los requisitos específicos de cada país recae en la organización o institución.

14. CONTROL DE CALIDAD

Los resultados son válidos solamente si el ensayo ha sido realizado de acuerdo con las instrucciones. Además el usuario debe atenerse a las Prácticas de Buen Laboratorio (GLP) u otras normas o leyes comparables. Para la determinación del diagnóstico, el usuario y/o el laboratorio deben de tener un sistema validado de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP). Los valores de los controles del ensayo deben encontrarse dentro de los rangos de aceptación indicados en las etiquetas y el Certificado QC. Si este criterio no se cumple, el ensayo no es válido y debe repetirse. Cada laboratorio debe emplear muestras conocidas como controles adicionales.

En caso de detectarse alguna desviación, se debe verificar lo siguiente: Fecha de vencimiento de los reactivos, condiciones de almacenamiento, pipetas, dispositivos, condiciones de incubación y método de lavado.

Se recomienda participar en los programas de aseguramiento de la calidad adecuados.

15. CÁLCULO DE RESULTADOS

La DO de los estándares (eje-y, lineal) se plotean contra su concentración (eje-x, logarítmico) ya sea en papel semi-logarítmico o empleando un método automático. Se logra un buen ajuste con cubic spline, 4 Parameter Logistics or Logit-Log.

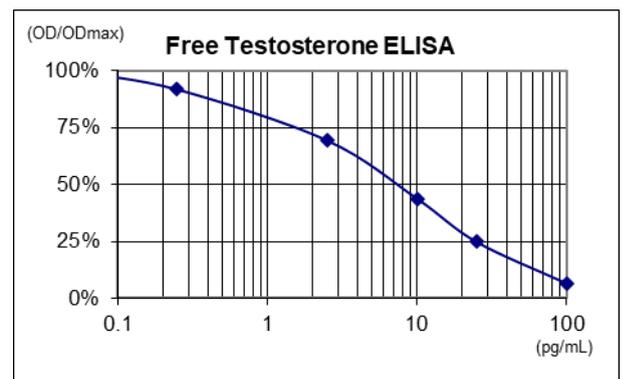
Para el cálculo de la curva estándar, Aplique cada señal de los estándares (los duplicados con un valor obviamente fuera de límites debe omitirse y emplearse el valor único más plausible).

La concentración de las muestras se puede leer directamente de la curva estándar.

Curva de Calibración Típica

(Ejemplo. ¡No usar para el cálculo!)

Estándar	Testosterona	DO _{Media}	DO/DO _{max}
A	0.0 pg/mL	2.477	100 %
B	0.25 pg/mL	2.276	92 %
C	2.5 pg/mL	1.722	70 %
D	10 pg/mL	1.086	44 %
E	25 pg/mL	0.615	25 %
F	100 pg/mL	0.162	7 %



Rango de medición: 0.52 pg/mL (LdC como sensibilidad funcional) a 25 pg/mL (Estándar E).

16. VALORES ESPERADOS

Los resultados por sí solos no deben ser la única razón para un tratamiento terapéutico, sino que deben correlacionarse con observaciones clínicas y ensayos de diagnóstico. Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio rango de valores normales.

Los sujetos aparentemente sanos presentan los siguientes valores:

Mujeres

Edad	n	Mediana	5. - 95. percentil	Intervalo min./max.
18 - 19 años	12	1.83 pg/mL	0.98 - 3.4 pg/mL	0.83 - 4.38 pg/mL
20 - 39 años	30	1.68 pg/mL	0.84 - 3.4 pg/mL	0.79 - 3.98 pg/mL
40 - 60 años	34	1.41 pg/mL	0.82 - 2.3 pg/mL	0.59 - 3.12 pg/mL
61 - 78 años	25	1.05 pg/mL	0.66 - 2.3 pg/mL	0.27 - 2.33 pg/mL

Para las mujeres sanas (n = 101) se calculó un valor medio de 1.56 pg/mL, que concuerda con el 1.2 pg/mL (0.9 - 2.1; percentil 25 % - 75 %) notificado en la bibliografía.^[4]

Hombres

Edad	n	Mediana	5. - 95. percentil	Intervalo min./max.
18 - 19 años	13	16.79 pg/mL	10.5 - 22.3 pg/mL	10.34 - 23.30 pg/mL
20 - 29 años	15	16.11 pg/mL	8.4 - 25.4 pg/mL	2.93 - 28.13 pg/mL
30 - 39 años	17	12.94 pg/mL	7.1 - 17.5 pg/mL	6.65 - 18.21 pg/mL
40 - 49 años	18	11.51 pg/mL	6.3 - 17.8 pg/mL	5.81 - 20.98 pg/mL
50 - 59 años	12	9.59 pg/mL	7.2 - 13.9 pg/mL	6.32 - 15.15 pg/mL
60 - 69 años	19	11.12 pg/mL	4.0 - 17.9 pg/mL	1.08 - 17.91 pg/mL
70 - 79 años	9	10.56 pg/mL	3.1 - 14.6 pg/mL	12.4 - 15.14 pg/mL
80 - 81 años	2	7.96 pg/mL	7.6 - 8.3 pg/mL	7.61 - 8.31 pg/mL

En el caso de los hombres sanos (n = 105), los valores medios medidos con IBL Free Testosterone ELISA se clasificaron por edades y se compararon con los valores medios indicados en la bibliografía^[15], encontrándose concordancia para cada clase. Se pudo confirmar que la concentración de testosterona libre en suero disminuye con la edad, tal como se indica en la bibliografía.

17. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

La toma de la muestra y almacenamiento tiene un efecto importante en los resultados. Vea TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO para mayores detalles. Para reactividad cruzada, vea PRUEBAS FUNCIONALES.

Los siguientes componentes sustancias no tienen un efecto significativo (+/- 20 % del esperado) en los resultados del ensayo en las concentraciones indicadas	Hemoglobina	5.0 mg/mL
	Bilirrubina	5.0 mg/mL
	Triglicéridos	22.8 mg/mL
	ASB	0.5 % (w/w)
	Azida de sodio	0.1 % (w/w)
	ProClin 300	0.1 % (w/w)
	Timerosal	0.01 % (w/w)
	Albúmina de suero humana	2.5 µg/dL
	SHBG (Sex Hormone Binding Globulin)	200 µg/mL

18. PRUEBAS FUNCIONALES

18.1. Límite del Blanco (LdB)

El estudio LdB fue realizado en un día de prueba por un operador. Las ejecuciones se realizaron con los controles del kit alto y bajo y con el calibrador cero (Estándar A). El calibrador cero se probó 22 veces usando un lote de reactivo. Límite de blanco = 0.10 pg / mL.

18.2. Límite de Cuantificación (LdC como sensibilidad funcional)

El estudio LdC fue realizado durante un día de prueba por un operador. Las ejecuciones se realizaron con los controles de kit alto y bajo y cinco muestras diferentes de suero humana con concentraciones de baja a media. Cada muestra se probó diez veces utilizando un lote de reactivos.

Límite de cuantificación = 0.52 pg / mL. (con una precisión inferior al 20 %).

18.3. Trazabilidad Metrológica

El ensayo Free Testosterone ELISA es trazable metrológicamente a unidades SI pg/ml utilizando un procedimiento de medición de referencia con un Radioinmunoensayo (RIA) de testosterona libre disponible comercialmente según EN ISO 17511. Este método de referencia está calibrado contra un estándar de referencia interno. Los valores se definen por cálculo matemático de la Testosterona frente a la Testosterona Libre. Este método y los rangos de medición son aceptados por los laboratorios desde hace muchos años.

Cuando se comparan los inmunoensayos con el método estándar de oro, la diálisis de equilibrio (DE) según Gardner *et al.*^[*], los valores de referencia de las mujeres están en concordancia, pero los valores de los hombres se encuentran 6 veces por debajo de la DE (Ver tabla).

Tabla: Comparación de los valores normales de testosterona libre

	Valores normales		
	IBL (min - max)	RIA (min - max)	Diálisis de equilibrio del trazador Gardner <i>et al.</i> ^[*]
Mujeres (>18 años)	0.7 - 3.4 pg/mL	0.3 - 4.3 pg/mL	0.1 - 6.4 pg/mL
Hombres (>18 años)	3.1 - 25.4 pg/mL	4.5 - 27.8 pg/mL	35 - 155 pg/mL

La diálisis de equilibrio es el método estándar de referencia aceptado. En él, se utilizan membranas selectivamente permeables para separar la testosterona libre de las fracciones unidas a proteínas y, a continuación, se cuantifica por espectrometría de masas. Sin embargo, este método no solo requiere mucho tiempo, sino que también es costoso y solo se realiza en algunos laboratorios (Kacker *et al.*^[**]; Vermeulen *et al.*^[***]).

Los valores asignados a los Estándares y Controles son trazables al método de referencia con una incertidumbre media del 11.6 %.

La conmutación del material de referencia de IBL para muestras de suero está respaldada por la buena correlación entre el procedimiento de referencia elegido Radioinmunoensayo (RIA) y el Free Testosterone ELISA de IBL.

Tabla: análisis de Passing-Bablok y coeficiente de Pearson

Free Testosterone ELISA = 1.019 X RIA + 0.2489	n = 85	Y = m x X + b	r = 0.97
--	--------	---------------	----------

Los valores del coeficiente de correlación y la desviación difieren ligeramente del análisis de regresión en la comparación de métodos aunque se utilizaron los mismos datos. Esto se debe al diferente método de cálculo utilizado para la trazabilidad. Aquí se utilizó el análisis de Passing-Bablok. En la comparación de métodos, se utilizó el análisis de regresión para el cálculo.

[*] David G. Gardner, Dolores Shoback, 2018. Greenspan's basic & clinical endocrinology, 10th Edition, pp. 865

[**] Kacker, R., Hornstein, A., & Morgentaler, A. (2013). The Aging Male, 16(4), 164-168.

[***] Vermeulen, A., Verdonck, L., & Kaufman, J. M. (1999). The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84(10), 3666-3672.

18.4. Comparación de Métodos

La testosterona libre en 85 muestras de suero recolectadas de individuos aparentemente sanos se evaluó mediante el método de comparación y el ELISA de IBL. Todas las muestras fueron tomadas y almacenadas a -20°C. Los resultados obtenidos se utilizaron para determinar la correlación entre el ELISA de IBL y el RIA disponible comercialmente.

Tabla: Resumen del método de comparación / análisis de regresión

y	x	n	r ²	r	y = bx + a
DB52181	Ensayo Comercial RIA	85	0.944	0.972	y = 1.019x + 0.2489

18.5. Especificidad Analítica (Reactividad Cruzada)

El estudio de reactividad cruzada se realizó con controles del kit alto y bajo. El estándar A fue enriquecido con sustancias potencialmente interferente en diferentes concentraciones. Cada concentración se probó por duplicado usando un lote de reactivo.

Substancia		Reactividad Cruzada
11 β -Hidroxitestosterona	(4-Androsten-11 β ,17 β -diol-3-one)	8.67 %
11 α -Hidroxitestosterona	(4-Androsten-11 α -,17 β -diol-3-one)	3.24 %
Dihydrotestosterona	(5 α -Androstan-17 β -ol-3-one)	1.92 %
Androstenediona	(4-Androstene-3,17-dione)	0.83 %
Metiltestosterona	(4-Androsten-17 α -methyl-17 β -ol-3-one)	0.44 %
DHEA-S	(5-Androsten-3 β -ol-17-one sulfate)	0.07 %
Sulfato testosterona	(4-Androsten-17 β -ol-3-one sulfate)	0.04 %
Progesterona	(4-Pregnen-3,20-dion)	0.03 %
Sulfato androsterona	(5 α -Androsten-3 α -ol-17-one sulfate)	0.02 %
Androsterona	(5 α -Androstan-3 α -ol-17one)	0.01 %
Desidroepiandrosterona	(5-Androsten-3 β -ol-17-one)	0.01 %
Pregnenolona	(5-Pregnen-3 β -ol-20-one)	< 0.01 %
Norgestrel	(4-Estren-17 α -Ethyanyl-18-homo-17 β -ol-3-one(+/-))	< 0.01 %
Deoxycorticosterona	(4-Pregnen-21-ol-3,20-dione)	< 0.01 %
Dexametasona	(9 α -Fluor-16 α -methyl-prednisolone)	< 0.01 %
Cortisona	(4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,11,20-trion)	< 0.01 %
Ethinilestradiol	(1,3,5(10)-Estratrien-17 α -Ethyanyl-3,17 β -diol)	< 0.01 %
Noretindrona	(4-Estren-17 α -Ethyanyl-17 β -ol-3-one)	< 0.01 %
Estrona	(1,3,5(10)-Estratrien-3-ol-17-one)	< 0.01 %
Corticosterona	(4-Pregnen-11 β ,21-diol-3,20-dione)	< 0.01 %
17 α -Hidroxipregnenoleno	(5-Pregnen-3 β ,17 α -diol-20-one)	< 0.01 %
17 α -Hidroxiprogesterona	(4-Pregnen-17 α ol-3,20-dione)	< 0.01 %
Cortisol, Hidrocortisona	(4-Pregnen-11 β ,17,21-triol-3,20-dione)	< 0.01 %
Epiestradiol	(1,3,5(10)-Estratrien-3,17 α -diol)	< 0.01 %
Prednisolona	(1,4-Pregnadien-11 β ,17 α ,21-triol-3,20-dione)	< 0.01 %
11-Deoxycortisol	(4-Pregnen-17 α ,21-diol-3,20-dione)	< 0.01 %
Sulfato colesterol	(5-Cholesten-3 β -ol sulfate)	< 0.01 %
6 α -Metil-17 α -Hidroxiprogesterona-acetate	(6 α -methyl-4-pregnen-3,20-dion,17acetate)	< 0.01 %
Estriol	(1,3,5(10)-Estratrien-3,16 α ,17 β -triol)	< 0.01 %
17 β -Estradiol-17 sulfato	(1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol 17-sulfate)	< 0.01 %
Prednisona	(1,4-Pregnadien-17 α ,21-diol-3,11,20-trion)	< 0.01 %
6 α -Metil-17 α -Hidroxiprogesterona	(6 α -methyl-4-pregnen-17 α -ol-3-20-dione)	< 0.01 %
17 α -Hidroxiprogesterona-17 sulfato	(4-Pregnen-17 α -ol-3,20-dione sulfate)	< 0.01 %

18.6. Linealidad

La linealidad de la Free Testosterone ELISA no se puede determinar porque no se dispone de un método de referencia independiente para la determinación de Testosterona libre. Como el equilibrio de testosterona libre a total depende tanto de la concentración de testosterona como de la concentración de proteínas de unión, no se puede calcular la recuperación.

18.7. Recuperación

La recuperación de la Free Testosterone ELISA no se puede determinar porque no se dispone de un método de referencia independiente para la determinación de Testosterona libre. Como el equilibrio de testosterona libre a total depende tanto de la concentración de testosterona como de la concentración de proteínas de unión, no se puede calcular la recuperación.

18.8. Precisión

El estudio **Intra-Assay** se realizó durante un día utilizando un lote de reactivos. Las pruebas se realizaron con controles de kit alto y bajo y con un panel de tres muestras de suero. Cada muestra fue analizada 20 veces.

Tabla: Resumen de la variación intraensayo de tres muestras de suero diferentes.

Muestra No	n	Media ± DE	CV
1	20	1.7 ± 0.2 pg/mL	12.8 %
2	20	5.0 ± 0.3 pg/mL	6.7 %
3	20	25.5 ± 1.1 pg/mL	4.4 %

La precisión del ensayo interno mostró un CV medio de 7.8 % y un rango de 4.4 - 12.8 % para las tres muestras de suero diferentes.

El estudio **Inter-Assay** se llevó a cabo utilizando un lote de reactivos. Se realizaron 11 ensayos con controles de kit altos y bajos y con un panel de tres muestras de suero. Cada muestra se analizó por duplicado.

Tabla: Resumen de la variación entre ensayos de tres muestras de suero diferentes

Muestra No	n	Media ± DE	CV
1	11	0.92 ± 0.1 pg/mL	7.5 %
2	11	2.10 ± 0.2 pg/mL	7.4 %
3	11	15.11 ± 1.3 pg/mL	8.8 %

La precisión del Interensayo mostró un CV medio de 7.9 % y un rango de 7.4 - 8.8 % para las tres muestras de suero diferentes.

El estudio **Inter-Lot** se llevó a cabo utilizando tres lotes de reactivos. Se realizaron 12 ensayos con un panel de tres muestras de suero. Cada muestra fue probada por duplicado.

Tabla: Resumen de la variación entre los lotes de tres muestras de suero diferentes

Muestra No	n	Media ± DE	CV
1	12	1.01 ± 0.2 pg/mL	22.4 %
2	12	2.11 ± 0.2 pg/mL	8.2 %
3	12	14.9 ± 0.6 pg/mL	3.7 %

La variación entre lotes mostró un CV medio del 11.4 % y un rango de 3.7 - 22.4 % para las tres muestras de suero diferentes.

19. REFERENCIAS SOBRE EL PRODUCTO

- [1] Tygi, V., Scordo, M., Yoon, R. S., Liporace, F. A., & Greene, L. W. (2017). Revisiting the role of testosterone: Are we missing something?. *Reviews in urology*, 19(1), 16
- [2] Burger, H. G. (2002). Androgen production in women. *Fertility and sterility*, 77, 3-5.
- [3] Brambilla, D. J., Matsumoto, A. M., Araujo, A. B., & McKinlay, J. B. (2009). The effect of diurnal variation on clinical measurement of serum testosterone and other sex hormone levels in men. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(3), 907-913.
- [4] DeVan, M. L., Bankson, D. D., & Abadie, J. M. (2008). To what extent are free testosterone (FT) values reproducible between the two Washingtons, and can calculated FT be used in lieu of expensive direct measurements?. *American journal of clinical pathology*, 129(3), 459-463.
- [5] Brooks, R. V. (1975). 1 Androgens. *Clinics in endocrinology and metabolism*, 4(3), 503- 520.
- [6] Shea, J. L., Wong, P. Y., & Chen, Y. (2014). Free testosterone: clinical utility and important analytical aspects of measurement. *Advances in clinical chemistry*, 63, 59-84.
- [7] Kumar, P., Kumar, N., Thakur, D. S., & Patidar, A. (2010). Male hypogonadism: Symptoms and treatment. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 1(3), 297.
- [8] Clifton, S., Macdowall, W., Copas, A. J., Tanton, C., Keevil, B. G., Lee, D. M., ... & Wu, F. C. W. (2016). Salivary testosterone levels and health status in men and women in the British general population: findings from the Third National Survey of Sexual Attitudes and Lifestyles (Natsal-3). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 101(11), 3939- 3951.
- [9] Wood, P. (2009). Salivary steroid assays—research or routine?. *Annals of clinical biochemistry*, 46(3), 183-196.
- [10] New, M. I., & Josso, N. (1988). Disorders of gonadal differentiation and congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 17(2), 339-366.
- [11] Dumesic, D. A. (1995). Hyperandrogenic anovulation: A new view of polycystic ovary syndrome. *Postgrad. Obstet. Gynecol*, 15, 1-6.
- [12] Škrgatić, L., & Trgovčić, I. (2013). Hyperandrogenemia association with acne and hirsutism severity in Croatian women with polycystic ovary syndrome. *Acta dermatovenerologica Croatica: ADC*, 21(2), 105-112.
- [13] Moreno-Pérez, O., Escoín, C., Serna-Candel, C., Portilla, J., Boix, V., Alfayate, R., ... & Picó, A. (2010). The determination of total testosterone and free testosterone (RIA) are not applicable to the evaluation of gonadal function in HIV-infected males. *The journal of sexual medicine*, 7(8), 2873-2883.
- [14] Lerchbaum, E., Schwetz, V., Rabe, T., Giuliani, A., & Obermayer-Pietsch, B. (2014). Hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome: exploration of the role of free testosterone and androstenedione in metabolic phenotype. *PLoS One*, 9(10), e108263
- [15] Sato Y, Tanda H, Kato S, Onishi S, Nakajima H, Nanbu A, Nitta T, Koroku M, Akagashi K, Hanzawa T, Shinozaki T, Terao N, Fujisaki N, Kuwabara M, Niimura K. Serum testosterone levels using the radioimmunoassay method in healthy Japanese male volunteers. *Reprod Med Biol*. 2006 Mar 1;5(1):37-41. doi: 10.1111/j.1447-0578.2006.00121.x. PMID: 29699234; PMCID: PMC5906832.

Symbols / Symbole / Symboles / Símbolos / Simboli / Símbolos / Σύμβολα

	Cat.-No.: / Kat.-Nr.: / No.- Cat.: / Cat.-No.: / N.-Cat.: / N.º Cat.: / Αριθμός-Κατ.:
	Lot-No.: / Chargen-Bez.: / No. Lot: / Lot-No.: / Lotto n.: / Lote N.º: / Αριθμός -Παραγωγή:
	Use by: / Verwendbar bis: / Utiliser à: / Usado por: / Da utilizzare entro:/ Usar até: / Χρησιμοποιείται από:
	No. of Tests: / Kitgröße: / Nb. de Tests: / No. de Determ.: / Quantità dei tests: / N.º de Testes: / Αριθμός εξετάσεων:
	Concentrate / Konzentrat / Concentré / Concentrar / Concentrato / Concentrado / Συμπύκνωμα
	Lyophilized / Lyophilisat / Lyophilisé / Liofilizado / Liofilizzato / Liofilizado / Λυοφιλοποιημένο
	In Vitro Diagnostic Medical Device / In-vitro-Diagnostikum / Appareil Médical pour Diagnostics In Vitro / Dispositivo Médico para Diagnóstico In Vitro / Dispositivo Medico Diagnostico In vitro / Equipamento Médico de Diagnóstico In Vitro / Ιατρική συσκευή για In-Vitro Διάγνωση
	Contains biological material of human origin / Enthält biologisches Material menschlichen Ursprungs / Contient une substance biologique d'origine humaine / Contiene material biológico de origen humano / Contiene materiale biologico di origine umana / Contém material biológico de origem humana / Περιέχει βιολογικό υλικό ανθρώπινης προέλευσης
	Contains biological material of animal origin / Enthält biologisches Material tierischen Ursprungs / Contient une substance biologique d'origine animale / Contiene material biológico de origen animal / Contiene materiale biologico di origine animale / Contém material biológico de origem animal / Περιέχει βιολογικό υλικό ζωικής προέλευσης
	Unique Device Identification / Eindeutige Geräteerkennung / Identifiant de dispositif unique / Identificación única de producto / Identificatore univoco del dispositivo / Identificador de dispositivo único / Μοναδικός αναγνωριστικός κωδικός προϊόντος
	Read instructions before use / Arbeitsanleitung lesen / Lire la fiche technique avant emploi / Lea las instrucciones antes de usar / Leggere le istruzioni prima dell'uso / Ler as instruções antes de usar / Διαβάστε τις οδηγίες πριν την χρήση
	Keep away from heat or direct sun light / Vor Hitze und direkter Sonneneinstrahlung schützen / Garder à l'abri de la chaleur et de toute exposition lumineuse / Manténgase alejado del calor o la luz solar directa / Non esporre ai raggi solari / Manter longe do calor ou luz solar directa / Να φυλάσσεται μακριά από θερμότητα και άμεση επαφή με το φως του ηλίου
	Store at: / Lagern bei: / Stocker à: / Almacene a: / Armazena a: / Conservare a: / Armazena em: / Αποθήκευση στους:
	Store at: 2 - 8°C / Lagern bei: 2 - 8°C / Stocker à: 2 - 8°C / Almacene a: 2 - 8°C / Armazena a: 2 - 8°C / Conservare a: 2-8°C / Armazena em: 2-8°C / Αποθήκευση στους: 2-8°C
	Manufacturer: / Hersteller: / Fabricant: / Productor: / Fabricante: / Fabbricante: / Παραγωγός:
	Distributor: / Distributor: / Distributeur: / Distributor: / Distributore: / Distribuidor: / Διανομέας:
	Caution! / Vorsicht! / Attention! / ¡Precaución! / Attenzione! / Cuidado! / Προσοχή!
	Symbols of the kit components see MATERIALS SUPPLIED. Die Symbole der Komponenten sind im Kapitel KOMPONENTEN DES KITS beschrieben. Voir MATERIEL FOURNI pour les symboles des composants du kit. Símbolos de los componentes del juego de reactivos, vea MATERIALES SUMINISTRADOS. Per i simboli dei componenti del kit si veda COMPONENTI DEL KIT. Para símbolos dos componentes do kit ver MATERIAIS FORNECIDOS. Για τα σύμβολα των συστατικών του κιτ συμβουλευτείτε το ΠΑΡΕΧΟΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ.

Generic table, not all symbols are present in the product

COMPLAINTS: Complaints may be submitted initially written or vocal. Subsequently they need to be filed including the test performance and results in writing in case of analytical reasons.

WARRANTY: The product is warranted to be free from material defects within the specific shelf life and to comply with product specifications delivered with the product. The product must be used according to the Intended use, all instructions given in the instructions for use and within the product specific shelf life. Any modification of the test procedure or exchange or mixing of components of different lots could negatively affect the results. These cases invalidate any claim for replacement.

LIMITATION OF LIABILITY: IN ALL CIRCUMSTANCES THE EXTENT OF MANUFACTURER'S LIABILITY IS LIMITED TO THE PURCHASE PRICE OF THE KIT(S) IN QUESTION. IN NO EVENT SHALL MANUFACTURER BE LIABLE FOR ANY INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL DAMAGES, INCLUDING DAMAGES FOR LOST PROFITS, LOST SALES, INJURY TO PERSON OR PROPERTY OR ANY OTHER INCIDENTAL OR CONSEQUENTIAL LOSS.

The labelling of hazardous substances is according to European directive.

For further country-specific classifications, please refer to the corresponding safety data sheet.



IBL International GmbH

Flughafenstrasse 52a
22335 Hamburg, Germany

Phone: +49 (0)40-53 28 91-0
Fax: +49 (0)40-53 28 91-11

IBL@tecan.com
www.tecan.com/ibl

Always there for you