

INSTRUÇÕES DE USO

TESTOSTERONA ELISA

Teste de ELISA para a Determinação Quantitativa de Testosterona em Soro ou Plasma Humano

Reagentes suficientes para 96 determinações

1. SUMÁRIO

A Testosterona é um hormônio sexual masculino primariamente sintetizado nos testículos. É também produzido pelos ovários, córtex adrenal e pela conversão periférica da androstenediona na mulher. Uma grande porção da Testosterona secretada é transportada na circulação sanguínea de forma ligada a uma beta-globulina, enquanto que uma pequena fração se liga à albumina ou circula na forma livre.

Nos homens, a Testosterona é responsável pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias, sendo um importante indicador do funcionamento dos testículos. Os seus níveis apresentam variações circadianas com picos séricos máximos entre as 04:00 e 08:00 horas, e picos mínimos entre as 16:00 e 20:00 horas. Níveis elevados de Testosterona são encontrados na puberdade precoce e na hiperplasia adrenal.

Homens e mulheres que apresentem o comprometimento funcional dos receptores andrógenos ou tumores produtores de andrógenos nos testículos, ovários ou córtex adrenal, possuem níveis aumentados de Testosterona.

Em mulheres, níveis elevados de Testosterona estão associados ao hirsutismo, virilização, hiperplasia adrenal congênita e síndrome dos ovários policísticos.

Níveis baixos de Testosterona são encontrados no hipogonadismo primário (disgenesia testicular e Síndrome de Klinefelter) e nos quadros de Síndrome de Kallman, hipopituitarismo e criptorquidismo.

2. PRINCÍPIO

Neste método, os padrões da curva e as amostras de soro ou plasma em análise são adicionados aos respectivos poços da microplaca que foram previamente recobertos por anticorpos anti-Testosterona. A Testosterona presente na amostra biológica e nos padrões da curva, compete com a Testosterona conjugada à enzima peroxidase, pelas ligações aos anticorpos imobilizados na microplaca. Após a etapa de incubação, o excesso de Testosterona não-imobilizada é eliminado na etapa de lavagem e o substrato enzimático é então adicionado. A hidrólise do substrato pela peroxidase gera uma reação de cor azul. Esta, por sua vez, torna-se amarela após a adição da solução de parada. A intensidade da cor, cuja absorbância é lida a 450 nm, é inversamente proporcional à quantidade de Testosterona presente na amostra biológica. Através da construção de uma curva-padrão, é possível determinar quantitativamente a concentração do hormônio em amostras de soro ou plasma humano.

Tempo total de incubação: 1 hora e 15 minutos.

3. COMPONENTES DO KIT

- a. **MICROPLACA:** 1 placa contendo 12 tiras com 8 poços cada, recobertos com anticorpos monoclonais anti-Testosterona. Embalagem selada contendo dessecante.
Pronto para uso

- b. **PADRÕES DA CURVA:** 1 mL de soro humano diluído em solução protéica tamponada contendo Testosterona nas concentrações:
PADRÃO A: 0,0 ng/mL
PADRÃO B: 0,2 ng/mL
PADRÃO C: 1,0 ng/mL
PADRÃO D: 4,0 ng/mL
PADRÃO E: 16,0 ng/mL
Prontos para uso
- c. **CONJUGADO:** 12 mL de solução tampão contendo Testosterona conjugada à peroxidase. Contém estabilizantes e conservantes.
Pronto para uso
- d. **SUBSTRATO:** 12 mL de solução tamponada contendo tetrametilbenzidina (TMB) estabilizada e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).
Pronto para uso
- e. **SOLUÇÃO DE PARADA 0,15 M:** 12 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,15 M.
Pronto para uso
- f. **FOLHAS ADESIVAS:** 2 unidades.
- g. **MANUAL DE INSTRUÇÕES DE USO**

4. ARMAZENAMENTO

- Os reagentes e a Microplaca, na embalagem original inviolada, são estáveis até a data de validade determinada na etiqueta, se conservados entre 2 e 8 °C.
- As tiras não-utilizadas da Microplaca devem ser mantidas na embalagem original selada contendo o dessecante para a sua proteção contra a umidade e a luz.
- Não expor os reagentes à luz solar ou à luz forte durante o armazenamento ou utilização. Manter o Substrato sempre ao abrigo da luz.

5. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO-INCLUÍDOS NO KIT

- Água deionizada
- Micropipetas calibradas para 10 a 200 µL e 200 a 1.000 µL e suas respectivas ponteiros descartáveis
- Agitador tipo vórtex e papel absorvente
- Cronômetro
- Sistema de lavagem de placas manual ou automático com capacidade para 300 µL
- Leitora de microplacas com filtros a 450 nm e, se possível, a 620-630 nm

6. PRECAUÇÕES DE USO

O kit de **TESTOSTERONA ELISA** é somente para o uso em **DIAGNÓSTICO *IN VITRO***
MATERIAIS POTENCIALMENTE INFECCIOSOS

- Os Padrões da Curva contendo componentes de natureza humana, foram testados e determinados como não-reativos para HBsAg e para os anticorpos contra HCV e HIV. Apesar disso, não há nenhum método de teste que possa oferecer completa confiabilidade para ausência do vírus HIV, da Hepatite B ou de outros agentes infecciosos. Portanto, estes reagentes devem ser manipulados como materiais potencialmente infecciosos.

- Precauções devem ser adotadas ao coletar, armazenar e manipular as amostras biológicas.
- Usar luvas. Não pipetar com a boca. Não fumar, comer ou beber em áreas onde amostras ou reagentes do kit estiverem sendo manuseados.
- Não utilizar o produto após a data de validade.
- Evitar o contato do Substrato com agentes oxidantes ou superfícies metálicas através da utilização de recipientes plásticos descartáveis limpos ou estéreis.
- Manusear a solução de ácido sulfúrico (Solução de Parada) com cautela. Se houver contato com olhos e pele, lavar com água em abundância e procurar orientação médica.
- Os restos de amostras, reagentes e líquido de descarte devem ser descontaminados com solução desinfetante, tal como hipoclorito de sódio 5%, antes de serem desprezados.
- Para descartar os reagentes e o material biológico sugerimos aplicar as normas locais, estaduais e federais de proteção ambiental. Maiores informações, consultar as FISPQ dos produtos obtidas pelo e-mail sac@btibiotec.com.br ou pelo telefone (11) 5093.2288.

7. COLETA E PREPARO DA AMOSTRA

- Coletar as amostras de sangue e processá-las imediatamente para obtenção de soros ou plasmas sem hemólise. Para coleta do plasma, utilizar o anticoagulante EDTA ou Heparina.
- Amostras hemolisadas (“vermelhas”) e visualmente lipêmicas (“leitosas”) devem ser descartadas, pois podem gerar resultados falsos.
- Amostras que apresentem contaminação microbiológica evidenciada pela presença de filamentos, partículas fúngicas ou bacterianas, não devem ser utilizadas.
- As amostras biológicas devem ser congeladas a -20°C até o momento do uso. Evitar ciclos repetidos de congelamento e descongelamento das amostras.
- Se após a refrigeração ou congelamento, as amostras apresentarem restos de fibrina, centrifugá-las anteriormente ao uso.

8. PROCEDIMENTO

Operações Prévias

- Antes da realização do teste, estabilizar todos os componentes do kit e amostras à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e homogeneizá-los suavemente.
- Deixar que a Microplaca atinja a temperatura ambiente (+15 a +30°C) antes de abrir a sua embalagem. Separar somente as tiras necessárias à realização do teste, mantendo as restantes na embalagem contendo o dessecante. Retirar o ar da embalagem e fechá-la hermeticamente.
- Montar o protocolo de identificação e orientação de aplicação das amostras e dos Padrões da Curva na placa onde será realizada a análise. Seguir a orientação abaixo para dispensar os Padrões da Curva, as amostras biológicas e para preparar o Branco **SEMPRE EM DUPLICATA**.

Reagente	Posição
Branco	A1, B1
A	C1, D1
B	E1, F1
C	G1, H1
D	A2, B2
E	C2, D2
Amostras	A partir de E2

Realização do Teste

- Dispensar 25 µL dos Padrões da Curva e das amostras biológicas nos respectivos poços da Microplaca (em duplicata).

- b. Adicionar 100 µL do Conjugado em cada poço da Microplaca, exceto nos poços A1 e B1 do Branco.
- c. Agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. **Cobrir os poços com a folha adesiva e incubar a placa por 1 hora a + 37°C.**
- d. Descartar o conteúdo de todos os poços por aspiração ou decantação. Adicionar 300 µL de água deionizada, aspirar ou decantar o líquido e repetir o processo por mais 1 vez (total de 2 lavagens). Esta etapa deve ser realizada adequadamente para garantir resultados confiáveis e precisos. Remover o fluido restante batendo vigorosamente a placa invertida sobre folhas de papel absorvente. Se a remoção do líquido for feita por decantação, a placa deve ser seca em papel absorvente a cada lavagem.
- e. Dispensar 100 µL do Substrato em todos os poços (inclusive no Branco) e agitar a placa gentilmente por 20 a 30 segundos para a sua homogeneização. Cobrir novamente os poços com a folha adesiva e **incubar a placa por, exatamente, 15 minutos à temperatura ambiente (+15 a +30°C) e ao abrigo da luz.**
- f. Adicionar 100 µL da Solução de Parada em todos os poços (inclusive no Branco), na mesma seqüência de adição dos reagentes. Agitar a placa gentilmente por 15 a 20 segundos para a sua homogeneização.
- g. Ler a absorbância a 450 nm com o leitor de ELISA em, no máximo, 30 minutos. Usar os poços A1 e B1 como “Branco” para zerar o aparelho ou, quando isso não for possível, descontar o valor do “Branco” de todos os valores medidos.

9. CONTROLE DE QUALIDADE

- A cada ensaio é necessário repetir a curva-padrão. Se mais de uma placa for usada, cada uma deve ter sua própria curva-padrão.
- Para monitorar a performance do teste, é aconselhável incluir controles internos. Estes controles devem ser tratados como as demais amostras e seus valores devem ser determinados a cada ensaio.
- É aconselhável manter os registros de Controle de Qualidade para monitorar a performance dos reagentes em uso. Testes estatísticos adequados devem ser utilizados para verificar a reprodutibilidade dos ensaios. Diferenças significativas podem indicar alterações inobservadas nas condições experimentais ou a degradação dos reagentes do kit. Reagentes novos devem ser usados para determinar a causa das variações.

10. CÁLCULO DOS RESULTADOS

Através da construção de uma curva dose-resposta (curva-padrão) usando os Padrões fornecidos no kit, é possível calcular a concentração de Testosterona nas amostras testadas. Isso pode ser feito com o auxílio de qualquer programa de computador que faça gráfico ou manualmente em papel milimetrado.

- a. Registrar em uma tabela os valores de absorbância a 450 nm para cada poço correspondente aos Padrões da Curva e amostras biológicas. Calcular o **Valor Médio (VM)** das absorbâncias das duplicatas através da fórmula:

$$VM = \frac{(Abs1 + Abs2)}{2}$$

- b. Para construir a curva-padrão, utilizar os valores de absorbância de cada duplicata dos Padrões da Curva e não o valor médio das duplicatas.
- c. Plotar em um gráfico as absorbâncias das duplicatas dos Padrões da Curva (eixo Y vertical) em função da concentração de Testosterona correspondente (eixo X horizontal). Estabelecer o melhor traçado para a curva-padrão.
- d. Determinar a concentração de Testosterona (em ng/mL) para cada amostra biológica, projetando a absorbância média das duplicatas sobre a curva-padrão.

11. VALORES DE REFERÊNCIA

Os valores de referência para Testosterona em soro ou plasma são:

Mulheres: 0,2 – 1,2 ng/mL

Homens: 1,8 – 9,0 ng/mL

Crianças: 0,1 – 0,4 ng/mL

12. LIMITAÇÕES DO PROCEDIMENTO

Performance do Ensaio

- Amostras com contaminação microbiológica, lipêmicas, ictericas ou hemolisadas podem causar resultados duvidosos, portanto, não devem ser utilizadas.
- As soluções do kit devem estar límpidas e dentro do prazo de validade.
- Não devem ser utilizados componentes de diferentes lotes ou reagentes de outros fabricantes.
- Evitar a contaminação cruzada entre amostras e entre reagentes do kit.
- Para que os resultados sejam reprodutíveis, as instruções fornecidas devem ser rigorosamente seguidas, respeitando os limites de tempo e temperatura das incubações.
- A pipetagem deve ser precisa, evitando diferenças entre as duplicatas. Para que não ocorram variações significativas nos tempos de incubação, a pipetagem das amostras não deve exceder a 10 minutos e a adição dos reagentes deve ser efetuada sempre na mesma seqüência.
- Falhas nos procedimentos de lavagem podem levar a resultados inválidos.
- A leitora de microplacas mede a absorbância no sentido vertical. Desta forma, evitar tocar o fundo dos poços.
- Em caso de dúvidas, entrar em contato com o Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC) através do telefone (11) 5093.2288 ou do e-mail sac@btbiotec.com.br, tendo em mãos o nome e código do produto, bem como o número de lote impresso em cada um dos componentes do kit.

Interpretação

- O resultado obtido utilizando este kit é auxiliar ao diagnóstico clínico e deve ser interpretado associando-se ao histórico clínico dos pacientes, achados clínicos e outros procedimentos de diagnóstico.
- Cada laboratório deve estabelecer seus próprios critérios para interpretação dos testes, baseando-se na população em estudo.
- Este método permite a determinação de Testosterona humana em amostras biológicas que possuem o intervalo de concentração entre 0,2 a 16,0 ng/mL. Caso sejam quantificados valores superiores de Testosterona, diluir a amostra e considerar o fator de diluição durante o cálculo do resultado.
- O significado clínico da determinação da Testosterona pode se tornar inválido se o paciente estiver em tratamento com cortisona ou hormônios esteróides naturais ou sintéticos.

13. CARACTERÍSTICAS DE DESEMPENHO

Sensibilidade

A menor concentração de Testosterona detectável e que pode ser distinguida do Padrão A (0,0 ng/mL) é de 0,075 ng/mL, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

Especificidade

A possibilidade de ocorrência de reação cruzada do anticorpo anti-Testosterona foi calculada como a razão entre a dose da substância interferente e a dose de Testosterona necessária para obter-se a mesma absorbância. Em valores percentuais, quanto mais próximo de 100%, maior é a possibilidade da ocorrência de reatividade cruzada.

Substância	Reação Cruzada	Substância	Reação Cruzada
Testosterona	100%	Estrona	0%
Dihidrotestosterona (DHT)	16%	Prednisona	0%
Androstenediona	0,8%	17 β -estradiol	0%
Androsterona	0%	DHEA-S	0%
Cortisol	0%	Cortisona	0%

Precisão

Para determinar a precisão inter e intra-análise, foram testados *pool* de soros-controle com diferentes níveis de Testosterona. Observou-se um coeficiente de variação de 7,5% e 4,6% respectivamente.

Análise Comparativa

O produto "Testosterona ELISA" foi comparado a um outro análogo disponível para comercialização no mercado que utiliza a metodologia de Radioimunoensaio. Foram utilizadas amostras biológicas (N = 32) contendo diferentes níveis de Testosterona. A Equação de Regressão e o Coeficiente de Correlação apresentados na Tabela abaixo, indicam o alto grau de concordância entre os métodos.

Equação de Regressão	Coeficiente de Correlação
$y = 0,23 + 0,92 (x)$	0,956

14. GARANTIA DA QUALIDADE

Antes de serem liberados para o consumo, todos os produtos da BTI Bio Tecnologia Industrial Ltda são testados pelo Laboratório de Controle de Qualidade. A qualidade dos produtos é assegurada até a data de validade mencionada na embalagem de apresentação, desde que armazenados e transportados nas condições adequadas.

15. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Joshi, U. M., et al. Steroids 34 (1), p.35, 1979.
- Turkes, A., et al. J. Endocrinol. 81 (2), p.165, 1979.
- Ismail, A. A., Niswender, G. D., Midgley, A. R. J. Clin. Endocr. Metab. 34, p.177, 1972.
- Rajkowski, K.M., Cittanova N., Desfosses, B. and Jayle, M.F. Steroids. 29 (5), 1977.
- Holland, F.J. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am. 64, p.191, 1991.

VSG

FABRICADO POR: **BTI – Bio Tecnologia Industrial Ltda**
CNPJ: 03.654.699/0001-00 SAC (11) 5093 2288 – sac@btibiotec.com.br
Av. José Cândido da Silveira 2.100 – sls 08, 10 e 18 - Horto
CEP: 31.170-000 - Belo Horizonte – MG – Brasil
Resp. Técnico: Dr. Luiz Eduardo De Nicola - CRBM 1452

Registro na ANVISA: 8004957.0202

Código: IU 03/016
Versão: 00
Data de Revisão: 30/07/2008