



TESTO-RIA-CT KIP1709-96 Testes

Revisão: 08/07/2009

Diasource ImmunoAssays SA - Rue de l'Industrie 8, B-1400 Nivelles,
Belgium - Tel: +32 67 88 99 99 - Fax : +32 67 88 99 96

I. FINALIDADE

Radiomunoensaio para a dosagem quantitativa *in vitro* de Testosterona Humana (TESTO) em soro.

II. INFORMAÇÃO GERAL

A. Nome: DiaSource TESTO-RIA-CT Kit

B. CAT# : KIP1709 : 96 testes

C. Fabricado por: DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

III. INFORMAÇÃO CLÍNICA

A. Atividade Biológica:

Testosterona é um hormônio esteróide C-19 (peso molecular: 288 Da) que é produzida a partir da androstenediona nos testículos, adrenais e ovários. A testosterona é um precursor juntamente com a androstenediona, de estrogênios esteróides.


B. Aplicações Clínicas:

- **Significância clínica dos níveis de testosterona:** Fonte de testosterona:
 - Mulheres: Ovários, córtex adrenal, tecidos periféricos (por conversão de 50-60% de outros esteróides).
 - Homens: Testículos > 90%, córtex adrenal, tecidos periféricos.
- **Doença Clínica com altos níveis de testosterona:**
 - Mulheres: Hirsutismo e virilização, síndrome de ovário policístico, hiperplasia congênita de adrenal (com170H-PROG), tumores de origem adrenal e ovariana, câncer de mama.
 - Homens: Doença de unidade hipotalâmica pituitária, tumores malignos nos testículos, hiperplasia congênita de adrenal, câncer de próstata.
- **Doenças Clínicas com baixos níveis de testosterona:**
 - Hipogonadismo primário ou secundário, síndrome de Klinefelter, outra alteração cromossômica, hipopituitarismo, defeitos enzimáticos, orquidectomia e criptorquidismo, feminização testicular, cirrose hepática, algumas doenças auto-imunes como, por exemplo: síndrome de Sjögren, lúpus sistêmico.
- **Outras áreas para dosagem dos níveis de Testosterona:**
 - Fertilização *in vitro*: mulheres com alta resposta a gonadotrofina têm uma elevação significativa de testosterona.
 - Parâmetro pré-pubes e puberdade.
 - Determinação de sexo fetal no líquido amniótico.
 - A testosterona livre esta significativamente elevada em pessoas que sofrem de acne.
 - Acompanhamento do câncer e em situações patológicas; síndrome de testosterona baixa.

IV. PRINCÍPIOS DO MÉTODO

Uma quantidade fixa de esteróide marcado com I-125 compete com o esteróide a ser dosado presente na amostra ou no calibrador, por uma quantidade determinada de sítios de ligação do anticorpo imobilizados na parede do tubo de poliestireno. Não é necessária extração ou cromatografia, devido a alta especificidade dos anticorpos impregnados no tubo. Após 3 horas de incubação a 37°C, uma etapa de aspiração finaliza a reação de competição. Os tubos são então lavados com 3mL de solução de lavagem e aspirados novamente. A curva de calibração é plotada e a concentração de testosterona das amostras é determinada por interpolação da curva de calibração.

V. REAGENTES FORNECIDOS

Reagentes	Kit 96 Testes	Código de Cores	Reconstituição
 Tubo revestidos com anti-Testosterona	2 x 48	Verde	Pronto para Uso
Ab ¹²⁵ I TRACER: Testosterona marcada com I-125 (grau HPLC), em tampão fosfato-citrato com gelatina bovina e azida (< 0.1%)	1 frasco 55 mL 180 kBq	Vermelho	Pronto para Uso
CAL 0 Calibrador Zero em soro humano com azida (0.5%).	1 Frasco 1mL	Amarelo	Pronto para Uso
CAL N Calibradores N = 1 a 5 (veja os valores exatos nos rótulos dos frascos) em soro humano com azida (0.5%).	5 Frascos 0.5 mL	Amarelo	Pronto para Uso
WASH SOLN CONC Solução de Lavagem (TRIS-HCl)	1 Frasco 10 mL	Marrom	Diluir 70 x com água destilada (utilize agitador magnético).
CONTROL N Controles - N = 1 ou 2 em soro humano com timol.	2 Frascos Liofilizados	Prata	Adicionar 0.5 mL de água destilada

Nota: utilize o calibrador zero para a diluição das amostras.

VI. MATERIAIS NECESSÁRIOS NÃO FORNECIDOS

Os seguintes materiais são necessários e não fornecidos no kit:

- Água destilada;
- Pipeta para dispensar 50 µL e 500 µL com ponteiros descartáveis (é recomendada a utilização de pipetas exatas com ponteiros descartáveis)
- Agitador Vórtex;
- Agitador Magnético;
- Incubadora a 37°C;
- Seringa automática de 5mL para lavagem;
- Sistema para aspiração (opcional);
- Pode ser utilizado qualquer contador gama com capacidade de dosar I-125 (ganho mínimo de 70%).

VII. PREPARAÇÃO DOS REAGENTES

A. Controles: Reconstituir os controles com 0.5 mL de água destilada.

C. Solução de Lavagem de Trabalho: Prepare o volume adequado de solução de lavagem adicionando 69 volumes de água destilada para 1 volume de Solução de Lavagem concentrada (70x). Utilizar um agitador magnético para homogeneizar. Descarte a solução de lavagem preparada e não utilizada ao final do dia.

VIII. ARMAZENAMENTO E DATA DE VALIDADE DOS REAGENTES

- Antes de abertos ou reconstituídos, todos os componentes do kit são estáveis até a data de validade indicada em cada rótulo, se armazenados de 2 a 8°C.

- Após reconstituição, calibradores e controles são estáveis por 7 dias de 2 a 8°C. Para períodos mais longos, aliquotar e armazenadas a -20°C por 3 meses. Evite ciclos sucessivos de congelamento.

- Solução de Lavagem de trabalho deve ser usada no mesmo dia.

- Após sua primeira utilização, o tracer é estável até a data de validade, se mantido fechado na embalagem original de 2 a 8°C.

- Alteração na aparência física dos reagentes pode indicar instabilidade ou deterioração.

IX. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

- Amostras de soro devem ser mantidas de 2-8°C.

- Se o teste não for realizado em 24 horas é recomendado armazenar a -20°C.

- Evite ciclos sucessivos de congelamento.

X. PROCEDIMENTO**A. Notas de Manuseio**

Não utilize componentes do kit após a data de expiração.

Não misture materiais de lotes diferentes.

Deixe todos os reagentes a temperatura ambiente antes do uso.

Homogeneize completamente todos os reagentes e amostras por suave agitação ou rotação.

A fim de evitar contaminação dos reagentes, utilize ponteiras limpas descartáveis para a adição de cada reagente e amostras. Pipetas de alta precisão ou equipamento pipetador automático irá melhorar a precisão do ensaio.

Respeite os tempos de incubação.

Prepare a curva de calibração para cada ensaio, não utilize os dados de corridas anteriores.

B. Procedimento

1. Identifique os tubos revestidos em duplicata para cada calibrador, amostra e controle. Para a determinação da contagem total, identifique 2 tubos normais, não revestidos.

2. Rapidamente agite em vórtex os calibradores, controles e amostras e dispense 50µL de cada um deles em seus respectivos tubos.

3. Dispense 500 µL de Testosterona marcada com I-125 em cada tubo, incluindo os tubos para as contagens totais.

4. Agite a estante de tubos suavemente com as mãos para liberar qualquer bolha de ar presa.

5. Incube por 3 horas a 37°C.

6. Aspirar (ou decantar) o conteúdo de cada tubo (exceto os tubos de contagem total). Tenha a certeza de que a ponteira plástica do aspirador está atingindo o fundo do tubo revestido, a fim de remover todo o líquido.

7. Lave os tubos com 3 mL de solução de Lavagem de Trabalho (exceto os tubos de contagem total). Evite a formação de espuma durante a adição da solução de Lavagem de Trabalho.

8. Deixe os tubos invertidos por 2 minutos e aspire ao líquido restante.

9. Contar os tubos em contador gama por 60 segundos.

XI. CÁLCULO DOS RESULTADOS

1. Determine a média de contagem para cada tubo em duplicata.

2. Calcule a radioatividade ligada como a porcentagem de ligação determinada pelo calibrador zero de acordo com a seguinte fórmula:

$$B/B_0 \% = \frac{\text{Contagem (Calibrador ou amostra)}}{\text{Contagem (Calibrador zero)}} \times 100$$

3. Utilizando um papel gráfico log-logit ou semi-logarítmico de 3 ciclos, assinale os valores (B/B₀(%)) para cada calibrador como função da concentração de Testosterona de cada ponto de calibrador. Rejeite os pontos que saírem fora da curva.

4. Métodos computadorizados de redução de dados também podem ser utilizados para construir a curva de calibração. Se um processamento automático de resultados for utilizado, é recomendado um ajuste de curva: *4-parameter logistic function*.

5. Por interpolação dos valores das amostras (B/B₀ (%)), determine a concentração de Testosterona das amostras a partir da curva de calibração.

6. Para cada ensaio, a porcentagem do tracer total ligado na ausência de Testosterona não marcada (B₀/T) deve ser checado.

XII. Dados Típicos

Os dados a seguir devem ser utilizados somente como exemplo, não devem ser usados em detrimento dos dados reais obtidos pela curva de calibração.

TESTOSTERONA	cpm	B/B ₀ (%)
Contagem Total	56034	
Calibrador		
0.00 ng/ml	28383	100.0
0.11 ng/ml	20016	70.5
0.48 ng/ml	13255	46.7
1.55 ng/ml	7756	27.3
5.40 ng/ml	3495	12.3
16.40 ng/ml	1678	5.9

XIII. DESEMPENHO E LIMITAÇÕES**A. Limite de Detecção**

Vinte calibradores zero foram ensaiados juntamente com o conjunto de outros calibradores. O limite de detecção, definido com concentração aparente de dois desvios abaixo da média de contagem da ligação zero, foi de 0.05 ng/mL.

B. Especificidade

A porcentagem de reatividade cruzada estimada pela comparação da concentração fornecida a 50% de inibição é respectivamente:

Composto	Reatividade Cruzada (%)
DihidroTestosterona	0.31
Androstenediona	0.28
17-β-Estradiol	0.004
17-OH-Progesterona	0.004
Progesterona	0.01

DHEA	0.0006
Sulfato de DHEA	0.0002
Cortisol	< 0.0001
Danazol	0.001
Etinilestradiol	0.0004
Etisterona	0.003
Acetato de Ciproterona	< 0.0001
Dihidroprogesterona	0.004
Mesterolona	0.39
19 Nortestosterona	1.8

Nota: Esta tabela mostra a reatividade cruzada para anti-Testosterona.

C. Precisão

INTRA-ASSAY				INTER-ASSAY			
Soro	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)	Soro	N	<X> ± SD (ng/mL)	CV (%)
A	10	0.69 ± 0.03	4.6	A	20	0.55 ± 0.03	6.2
B	10	4.35 ± 0.14	3.3	B	20	3.51 ± 0.17	4.8
C	9	9.82 ± 0.44	4.4				

SD: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de variação.

D. Exatidão

TESTE DE DILUIÇÃO

Amostra	Diluição	Concentração Teórica (ng/mL)	Concentração dosada (ng/mL)
A	1/1	-	8.72
	1/2	4.36	4.08
	1/4	2.18	2.00
	1/8	1.09	1.08
	1/16	0.55	0.56
	1/32	0.27	0.23
B	1/1	-	6.98
	1/2	3.49	3.33
	1/4	1.75	1.59
	1/8	0.87	0.81
	1/16	0.44	0.42
	1/32	0.22	0.18

Amostras foram diluídas com o calibrador zero.

TESTE DE RECUPERAÇÃO

Amostra	Testosterona adicionada (ng/mL)	Testosterona Recuperada (ng/mL)	Recuperação (%)
1	0.22	0.19	86.4%
	0.46	0.51	110.9%
	1.36	1.5	110.3%
	3.28	3.09	94.2%
	9.8	12.2	124.5%

Fator de Conversão:

De ng/mL para nmol/L: x 3.47

De nmol/L para ng/mL: x 0.288

A concentração de calibradores é determinada com o método de referência ID-GC/MS.

E. Tempo de demora entre o último calibrador e pipetagem da amostra

Como mostrado, os resultados do ensaio permanecem exatos mesmo quando a amostra é dispensada 30 minutos após a adição do calibrador nos tubos revestidos.

Tempo de Demora

Soro Valores B/T	0'	10'	20'	30'
C1	27.9	28	28.6	28
C2	11.9	11.5	11.9	11.4

XIV. CONTROLE DE QUALIDADE INTERNO

- Se os resultados obtidos para o Controle 1 e/ou Controle 2 não estiverem dentro do intervalo especificado nos rótulos dos frascos, os resultados não podem ser validados, a não ser que uma explicação satisfatória seja dada para esta discrepância.

- Se desejar, cada laboratório poderá realizar seu próprio pool de amostras controles, as quais devem ser mantidas congeladas e aliqüotadas.

- Critérios de aceitação para diferença entre resultados de duplicatas devem estar entre as Boas Práticas de Laboratório.

XV. INTERVALOS DE REFERÊNCIA

Estes valores são fornecidos apenas como referência; cada laboratório deve estabelecer seus próprios valores de normalidade:

Mulheres Pré-menopausadas estavam com fase lútea normal (Progesterona >30 nmol/L), sem tratamento com clomid e nenhuma evidência de ciclo irregular. Mulheres pós-menopausadas (idade: 28 a 61) tinham FSH >30 IU/L e a maioria destas pacientes foram avaliadas em rotina para confirmação da situação recente de pós-menopausa ou falência ovariana prematura.

Identificação	Intervalo (*) (ng/mL)	Média	SD	n
Mulheres (determinado na Inglaterra)	0.11 - 0.79	0.39	0.17	100
	< 0.06 - 0.50	0.22	0.13	60
	- Pré-Menopausadas - Pós-Menopausadas			
Homens	2.12 - 7.60	4.29	1.61	138

(*) O intervalo é baseado em percentil de 2.5 % e 97.5 %

XVI. CUIDADOS E PRECAUÇÕES

Segurança

Somente para diagnóstico in vitro.

Este kit contém I-125 (meia-vida: 60 dias), ionização emitida X (28 keV) e radiações γ (35.5 keV).

Este produto radioativo só pode ser transferido e utilizado por pessoas autorizadas; a compra, armazenamento, uso e troca de radioativos estão sujeitas a legislação local em vigor. Em nenhum caso este produto deve ser administrado a humanos e animais.

Toda a manipulação de produtos radioativos deve ser executada em área apropriada, longe da circulação regular. Equipamentos de laboratório e vidraria, que possam estar contaminados com substância radioativa devem ser segregados a fim de prevenir a contaminação de diferentes radioisótopos. Qualquer resíduo de radioativo deve ser limpo imediatamente de acordo com os procedimentos de radioproteção. Os rejeitos radioativos devem ser dispostos de acordo com as regulamentações locais.

Os componentes sanguíneos humanos incluídos neste kit foram testados pelos métodos de aprovação Européia e/ou FDA e foram atestados negativos para HBsAg, anti-HCV, anti-HIV-1 e 2. Nenhum método pode oferecer total segurança de que derivados de soro humano não transmitirão hepatite, AIDS ou outras infecções. Desta forma, o manuseio dos reagentes, soro ou plasma devem estar de acordo com as leis de segurança locais.

Todos os produtos animais e derivados devem ser coletados a partir de animais saudáveis. Os componentes bovinos se originam de países onde BSE não foi reportada. No entanto, componentes contendo substâncias animais devem ser tratados como potencialmente infectantes.

Evite qualquer contato da pele com os reagentes (azida sódica como conservante). A azida sódica nestes kits pode reagir com chumbo e cobre das tubulações e desta forma gerar azidas metálicas explosivas. Durante a etapa de lavagem, deixe correr grande quantidade de água a fim de prevenir a formação de azida sódica.

Não fume, beba, coma ou aplique cosmético na área de trabalho. Não pipete com a boca. Utilize roupa de proteção e luvas descartáveis.

XVII. BIBLIOGRAFIA

1. J.L. ANDREYKO et al. (1986)
Role of Serum Androgens and Sex Hormone Binding Globulin Capacity in the Evaluation of Hirsutism in Women.
Clin. Biochem, Vol. 19, 58-61.
2. A. BIZZARO et al.
Influence of Testosterone Therapy on Clinical and Immunological features of Autoimmune Diseases Associated with Klinefelter's Syndrome
J. Clin. Endocrin. Metab. Vol. 64, N°1: 32-36
3. M. CARRABBA et al (1985)
Abnormalities of Sex hormones in Men with Systemic Lupus Erythematosus.
Clin. Rheumatology, N° 4: 422-425.
4. P. HILL et al. (1985)
Plasma Testosterone and Breast Cancer.
Eur.J Cancer Clin. Oncol, Vol. 21, N°10, pp. 1265-1266
5. CG. MAHLCK et al (1986)
Testosterone, SHBG and Albumin in Patients with ovarian carcinoma.
Acta Obstet. Gynecol. Scand. 65: 533-538.
6. D.M.D PERERA et 31 (1987)
Amniotic Fluid Testosterone and testosterone Glucuronide Levels in the determination of Foetal Sex.
J. Steroid Biochem., Vol. 26,N°2,pp.273-277.
7. J. TRACHTENBERG (1987)
Experimental Treatment of Prostatic Cancer by intermittent Hormonal Therapy.
J. Urology, Vol. 137, pp. 785-788.
8. R. MARUYAMA et al. (1987)
Sex-Steroid-Binding Plasma Protein (SBP), Testosterone, Oestradiol and DHEA in Prepuberty and Puberty.
Acta Endocrinologica, 114: 60-67
9. P. HOLDUNIA, C. WALTER et al (1992)
A clinical evaluation of a direct radioimmunoassay of testosterone.
Clin. Chim. Acta, 214:31-43.

Revisão Assessoria: 12/01/2010

Biom. Resp.: Dra. Adriana Beatriz C. Almeida – CRBM: 3828

Registro do Produto M.S.: 10337680116

CONSERVAR ENTRE +2 E + 8°C

Importado e distribuído por:

Genese Produtos Diagnósticos Ltda.

Autorização de Funcionamento M.S.:103376-8

Rua Diogo Vaz, 291 – CAMBUCI

CNPJ. 68.384.155/0001-02

CEP. 01527-020 - São Paulo - SP

Fabricado por:

DIAsource ImmunoAssays S.A.

Rue de l'Industrie, 8, B-1400 Nivelles, Belgium.

Atendimento ao consumidor - Fone (0xx)(11)-3341.6987

XVIII. RESUMO DO PROTOCOLO

	Contagem Total µL	Calibradores µL	Amostras(s) Controles µL
Calibradores (0 a 5)	-	50	-
Amostras, controles	-	-	50
Tracer	500	500	500
Incubação	3 horas a 37 °C		
Separação	-	Aspire (ou decante)	
Solução de Lavagem		3.0 mL	
Separação		aspire (ou decante)	
Contagem	Conte os tubos por 60 segundos		

DIAsource Catalogue Nr :
KIP1709

P.I. Number :
1700507/en

Revision nr :
090708/1